FACULTÉ MIXTE
DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE
DE MARSEILLE

CONTRIBUTION
A L'ÉTUDE DES SUBSTANCES FONGICIDES ORGANO-MERCURIQUES

Le problème de leur mise en évidence dans les farines et dans les pains
Leur devenir au cours de la panification et de la conservation du pain

THESE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté
de Médecine Générale et Coloniale et de Pharmacie de Marseille
le 12 Juillet 1956

par

Georges BARZILAY
né le 26 Septembre 1929

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Examinateurs de la thèse :

MM. PELLISSIER, Professeur — Président
BALANSARD, » — Assesseurs
DUMAZERT, » — Assesseurs
BERNARD, Agrégé — Assesseurs

LINO-IMP. - BOUL. DESPLACES - MARSEILLE

FACULTÉ MIXTE
DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE
DE MARSEILLE

CONTRIBUTION
A L'ÉTUDE DES SUBSTANCES FONGICIDES ORGANO-MERCURIQUES

Le problème de leur mise en évidence dans les farines et dans les pains

Leur devenir au cours de la panification et de la conservation du pain

R. UNIV
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

THESE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté
de Médecine Générale et Coloniale et de Pharmacie de Marseille
le 12 Juillet 1956

par

Georges BARZILAY
né le 26 Septembre 1929

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

MM. PELLISSIER, Professeur Président

Examinateurs de la thèse :

BALANSARD » — Assesseurs
DUMAZERT » — Assesseurs
BERNARD, Agrégé — Assesseurs

LINO-IMP. - BOUL. DESPLACES - MARSEILLE

PERSONNEL ENSEIGNANT

Doyen : G. MORIN — Assesseur : J. DELPHAUT

Professeurs honoraires : AUDIBERT, BELTRAMI, BREMOND, GABRIEL, HECKENROTH, JOYEUX, OLMER, RIMATTEI, ROCHE, MONGES.

Secrétaire Principal : J. COMTE — Bibliothécaire : M^lle PERRIN

PROFESSEURS

Anatomie	GRISOLI
Anatomie Pathologique	GASTAUT
Bactériologie et Pathologie générale	BRAHIC
Botanique et Cryptogamie	PELLISSIER
Cardiologie clinique et expérimentale	JOUVE
Chimie médicale	DERRIEN
Chimie Analytique et Hydrologie	ARNOUX
Chimie	DUMAZERT
Clinique Chirurgicale	CARCASSONNE
Clinique Chirurgicale	MOIROUD
Clinique Chirurgicale Infantile et Orthopédie	SALMON
Clinique Chirurgicale thérapeutique et Chirurgie expérimentale	DE VERNEJOUL
Clinique Dermato-syphiligraphique	CHARPY
Clinique Exotique	BLANC
Clinique des Maladies du Système Nerveux	POURSINES
Clinique Médicale	MATTEI
Clinique Médicale	POINSO
Clinique Médicale Thérapeutique	OLMER J.
Clinique des Maladies des Voies digestives et de la Nutrition	RECORDIER
Clinique Médicale Infantile	GIRAUD
Clinique Neuro-Chirurgicale	PAILLAS
Clinique Obstétricale et Gynécologique	CHOSSON
Clinique Ophtalmologique	JAYLE
Clinique Urologique	CHAUVIN
Histologie	PICARD
Hygiène et Médecine Préventive	SAUTET
Matière Médicale	BALANSARD
Médecine Légale et Médecine du Travail	MOSINGER
Parasitologie	RANQUE
Pathologie chirurgicale	DOR
Pathologie interne	AUDIER
Pharmacologie	MERCIER F.
Pharmacie chimique et Toxicologie	VIGNOLI
Pharmacie Galénique	DELPHAUT
Physiologie	MORIN
Physique Médicale	DUBOULOZ
Stomatologie	MARONNEAUD
Thérapeutique	PIERI
Professeur sans chaire	ROUX
» » »	DONNET

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

MM. BERNARD Pierre
BOURRET
DEPIED
DESNATI
MM. GAMBARELLI
GREBUS
LISSITZKY
MERCIER Jacques
MM. MOURGUE
PASTOR
PAYAN
TAMALET

AGREGES EN EXERCICE

MM. APFAIX
BERNARD René
MM. CHARPIN
CHAUVIN F.
CREMIEUX
DEVIN
MM. GRANJON
LAVAL
METRAS
MONGES H.
MOUREN
OLLIVIER
MM. ORSINI
OURGAUD
PAOLI
RAYBAUD
SERMENT

AGREGES LIBRES

MM. BERTHIER
FIGARELLA
HENRY
MM. IMBERT
LAMY
LENA
VAGUE

Chargés des fonctions de Maître de Conférences

Histologie ..... STAHL
Hygiène et Médecine Sociale ..... GEVAUDAN

Contribution à l'étude des substances fongicides organo-mercuriques

---

Le problème de leur mise en évidence dans les farines et dans les pains.

Leur devenir au cours de la panification et de la conservation du pain.

AVANT-PROPOS

AVANT d'entreprendre l'exposé de notre travail il nous est agréable de pouvoir exprimer notre gratitude à tous ceux qui ont, de près ou de loin, contribué à mener à bien notre thèse.

Nous remercions d'abord notre Maître, Monsieur le Professeur PELLISSIER, de la sincère sympathie qu'il nous a toujours témoignée, nous conduisant avec une infinie patience vers la conclusion des travaux qu'il nous avait fait l'honneur de nous confier. Nous lui savons gré aujourd'hui du plaisir qu'il nous apporte en présidant la soutenance de cette thèse.

Nous tenons à exprimer notre gratitude à Monsieur le Professeur BALANSARD pour l'intérêt qu'il a porté à notre travail et nous le remercions d'avoir bien voulu le juger.

Nous sommes reconnaissant envers Monsieur le Professeur DUMAZERT de l'accueil qu'il nous a réservé dans son laboratoire et des précieux conseils qu'il nous a prodigués pour la partie chimique de ce travail.

Nous remercions Monsieur le Professeur BERNARD du bienveillant intérêt qu'il nous a porté durant nos études et nous sommes heureux de pouvoir le compter parmi les membres de notre Jury.

Notre gratitude va également à nos camarades de Laboratoire, et en particulier à Christian SIBOURG, pour l'aide efficace qu'ils nous ont si souvent donnée.

Nous tenons à mentionner aussi l'inlassable dévouement dont a fait preuve à notre égard le personnel du Laboratoire de Botanique, Madame LUBIN, Monsieur RONDON et surtout Monsieur BALMA toujours prêts à nous rendre avec compétence les services que nous leur demandions.

INTRODUCTION

Bien que limité aux fongicides organo-mercuriques, ce travail s'intègre dans les recherches entreprises au Laboratoire de Botanique et de Cryptogamie au sujet de l'étude des substances fongicides.

Son idée directrice découle d'une observation effectuée à propos des accidents survenus à Pont-Saint-Esprit.

Les pains ayant vraisemblablement causé les intoxications présentaient un pouvoir inhibiteur total pour le développement des quatre champignons test : Alternaria, Rhizopus, Aspergillus et Penicillium. (Moisissures blanches ou vertes).

Connaissant le degré exceptionnel de résistance aux anticryptogamiques du Penicillium Roqueforti entre autre, on pouvait se demander si la présence d'une quantité de substance fongicide nécessaire pour entraîner l'inhibition du Penicillium était susceptible de permettre, dans des conditions normales, la fermentation panaire.

Le Professeur PELLISSIER, à qui était posé ce problème, l'avait résolu de la façon suivante : après avoir obtenu l'extrait aqueux d'un pain fongicide, l'extractum était ensemencé par de la levure de boulangerie en milieu « moût de bière ». Cette levure ayant conduit à une fermentation normale, mais retardée de quelques heures, il avait été conclu que la substance fongicide *pouvait être* présente dans la farine avant la panification.

Cependant, notre Maître envisagea de procéder à la reconstitution du phénomène. Dans ce but, des « doses » variables de fongicides furent incorporées à la pâte, en quantité telle que celle-ci présente une inhibition totale pour les quatre champignons test, mais n'altère pas sensiblement la levée de la pâte et la fermentation panaire.

Les résultats de ces expériences ayant démontré que les doses fongicides pour la levure de boulangerie et le Penicillium étaient très voisines, on arrivait à penser que ces conditions de pollution de la farine employée à Pont-Saint-Esprit avaient réalisé en fongicide, une concentration idéale susceptible de n'être rencontrée qu'exceptionnellement.

De cette observation naquit l'objet de notre travail.

OBJET DU TRAVAIL

Les résultats acquis que nous allons exposer ci-après constituent une preuve de l'intérêt qu'à présenté l'étude des substances fongicides introduites dans la pâte avant fermentation panaire en faisant jouer, d'une part le facteur panification, cuisson de la pâte, d'autre part le facteur temps : conservation du pain.

I. — C'est ainsi que nous nous sommes proposés en premier lieu de mettre au point une méthode biologique de détection et d'estimation des divers principes fongicides organo-mercuriques en substrat liquide et surtout dans les divers milieux que constituent la farine, la pâte, le pain.

Nous devions établir ensuite la notion de doses liminaires fongicides (concentrations nécessaires dans ces milieux pour inhiber la germination de tel ou tel champignon test).

II. — Nous devions envisager alors l'étude du problème suivant : l'utilisation d'une farine polluée par un principe organo-mercurique permet-elle à la fois une levée normale (sans inhibition de la levure) et l'obtention d'un pain fongicide pour les moisissures ?

C'est de l'étude de ces pains reconstitués que nous tirons les conclusions les plus inattendues de notre travail. Nos observations ayant porté sur les modifications d'ordre chimique subies par les principes fongicides au cours de la panification ou de la conservation des pains.

En fait, notre travail, fruit de plusieurs années de recherches et expérimentations, donne une explication sensiblement différente et plus vraisemblable de l'accident de Pont-Saint-Esprit.

PLAN GÉNÉRAL

Dans la première partie de notre travail, nous avons entrepris une étude succincte des organo-mercuriques de synthèse, nous attachant surtout, en ce qui concerne les dérivés utilisés comme fongicides agricoles, à exposer la législation à laquelle ils sont soumis, leur toxicologie et le traitement des intoxications qu'ils peuvent provoquer.

Exposées dans la deuxième partie de notre mémoire, nos recherches personnelles sont subdivisées en trois chapitres, dans lesquels nous exposons successivement :

1° les recherches préliminaires que nous a imposé la fabrication des pains fongicides ;

2° l'étude de ces pains, de leur fabrication, de la détermination de leur pouvoir fongicide et des phénomènes qu'ils nous ont permis de constater (augmentation du pouvoir fongicide avec le temps), et celle d'une souche fongicido-résistante accidentellement sélectionnée pendant nos travaux ;

3° l'exposé et la discussion des diverses hypothèses permettant d'expliquer l'origine de l'accident de Pont-Saint-Esprit.

PREMIERE PARTIE

ÉTUDE DES FONGICIDES ORGANO - MERCURIQUES

ÉTUDE DES SUBSTANCES FONGICIDES DE SYNTHÈSE

appartenant au groupe des organo-mercuriques

Les sels mercuriques minéraux sont connus depuis longtemps pour leurs propriétés fongicides et bactéricides. Le chlorure de mercure a été utilisé dès 1890 par Kellermann et Swingle, pour le traitement des maladies cryptogamiques des végétaux (caries, fusarioses) ; quant à son action anti-syphilitique, elle est mise à profit depuis plus longtemps encore.

Toutefois, l'emploi de ces dérivés minéraux était trop souvent accompagné de graves intoxications mercurielles pour les manipulateurs, intoxications dues à la toxicité élevée de ces corps.

L'intéressant pouvoir désinfectant et fongicide des sels mercuriques a conduit à rechercher des dérivés de ce métal possédant une toxicité moins forte pour l'homme et les animaux supérieurs.

Les composés organo-mercuriques, dans lesquels « le mercure est lié par une au moins de ses valences à un atome de carbone d'un radical hydrocarbure » (4), ce qui le dissimule toujours plus ou moins à l'action de ses principaux réactifs analytiques, résolvent le mieux ce problème.

De nombreux produits, au moins aussi actifs, du point de vue bactéricide ou fongicide, que les sels minéraux, ont été synthétisés dans ce groupe.

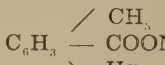
Les organo-mercuriques ainsi créés sont aujourd'hui largement utilisés dans de nombreux domaines.

En thérapeutique.

Certains organo-mercuriels sont d'énergiques bactéricides d'un emploi facile pour l'usage local ou la désinfection des instruments chirurgicaux.

Du point de vue chimique, le mercure est généralement lié, dans ces composés, d'une part, à un groupement phényle, de l'autre, à un oxydrile.

Parmi ces composés antiseptiques, on peut citer (8) :

Afridol —  — Hydroxymercuritoluitate de sodium

Mercurochrome — Hydroxymercuridibromomercurescéine sodique

Mercurophène — — Oxymercuriorthonitrophenolate de sodium.

Merphène — $C_6H_5 - Hg - O - B(OH)_2$ — Borate de phénylmercure

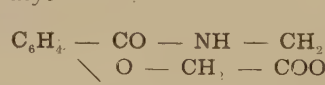
Merthiolate — — Ethylmercurithiosalicylate de sodium

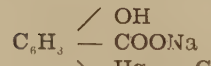
La toxicité de ces corps est très faible.

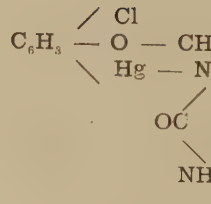
Pour présenter une action anti-syphilitique, les composés organo-mercuriques doivent avoir une valence du mercure liée à un élément inorganique ou à un acide organique, l'autre valence étant liée à un carbone aromatique ou aliphatique : les dérivés du type « diphénylmercure » sont inactifs sur la syphilis.

Parmi les organo-mercuriques injectables actifs contre la syphilis, nous citerons les composés ci-après (8) :

Toxinone — — Hydroxymercuriacetamidobenzoate de sodium

Mersalyl —  — Acétate mercurique salicylamidoacétate de sodium

Asurol —  — Salicylmercuriaminoxybutyrate de sodium

Novasurol —  — Mercurichlorophénoxyacétate de sodium-véronal

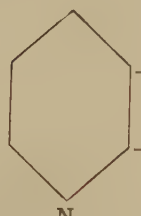
Quelques-uns des dérivés synthétiques se sont révélés être d'énergiques diurétiques, d'une grande utilité pour les cas d'œdèmes ou d'obésité. Certains ont, d'ailleurs, une double action, comme le Mersalyl et le Novasurol que nous avons déjà présentés parmi les anti-syphilitiques.

Seulement diurétiques sont les composés énoncés ci-dessous (8) :

Neptal $C_6H_4 \begin{cases} — CO — NH — CH_2 — CHOH — CH_2 — Hg — OH \\ — O — CH_2 — COOH \end{cases}$

Hydroxymercuripropanolamide de l'acide salicylacétique

Esidron

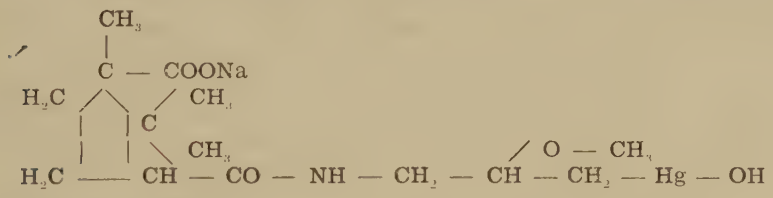


$— COONa$

$— CO — NH — CH_2 — CH \begin{cases} C_2H_5 \\ Hg — OH \end{cases}$

Hydroxymercuripropanolamidoquinoléate de sodium

Novurit - sel de sodium de l'acide hydroxymercuriallylamidomethoxytrimethylcyclopentane



EN AGRICULTURE.

En agriculture et dans l'industrie (industrie du papier, industrie du textile), ce sont essentiellement les propriétés fongicides des organo-mercuriques qui sont mises à profit. Propriétés d'ailleurs parfois utilisées en thérapeutique : l'azotate de phénylmercure sert au traitement des affections mycosiques de la peau et en particulier à celui de la teigne.

Les fongicides organo-mercuriques sont utilisés de préférence comme désinfectants du sol ou des semences, certains d'entre eux sont, en effet, nocifs pour la végétation. Il en est toutefois qui ne présentent pas cet inconvénient, comme l'éthylmercure paratoluène sulfone, par exemple, employé en pulvérisation contre la tavelure du pommier.

Pour la désinfection des semences, trois méthodes peuvent être mise en œuvre (13) :

— Méthode par immersion : les semences sont trempées dans une solution diluée de fongicide. L'action de ces derniers est fonction de la concentration, en principe actif, et de la durée de l'immersion.

Cette méthode oblige à semer aussitôt après le traitement.

— Méthode par enrobage humide : les semences sont traitées par le produit du commerce, sans dilution préalable, dans un cylindre rotatif bien fermé.

Cette méthode évite le resséchage des semis et permet de traiter les grains bien avant les semailles.

— Méthode par désinfection sèche : le fongicide en poudre fine est mélangé aux semences dans un tambour hermétique. La désinfection a lieu dans la terre où l'humidité du sol, en dissolvant la poudre, crée une zone désinfectante autour de la graine.

La désinfection des sols pourra être réalisée par des composés solubles ou insolubles ; ceux-ci imposent un labour profond après leur épandage en surface. La facilité d'emploi des dérivés solubles, pour lesquels il suffit d'arroser le sol à désinfecter avec la solution diluée de fongicide, est cependant diminuée par les précautions supplémentaires que leur plus grande toxicité, pour l'homme et les animaux domestiques, oblige de prendre.

Par ailleurs, les doses de fongicides doivent être bien déterminées, car s'il a été remarqué que les organo-mercuriques pouvaient entraîner une augmentation de la germination allant jusqu'à 8 ou 10 p. 100 (3), une trop forte concentration risque d'endommager la gemmule des semences. C'est pour cette raison que les semences désinfectées par des principes organo-mercuriques sont généralement traitées par des substances de croissance diverses appliquées à doses convenables; cette opération s'apparente à celle qui est connue sous le nom de « radoubage des vieilles semences ».

Chimiquement, les composés organo-mercuriques employés en agriculture possèdent, fixé sur l'une des deux valences du mercure, un radical carboné, et sur l'autre, un acide minéral, un oxhydrile ou un radical aryl ou alkyl. Dans la plupart de ces composés, le mercure n'est pas dialysable.

Les plus fréquemment utilisés des fongicides agricoles organo-mercuriques sont les suivants (4 - 11) :

Ceresan	$Cl - Hg - C_2H_5$	Chlorure d'éthylmercure
Samesan	$PO_4 (Hg - C_2H_5)_3$	Phosphate d'éthylmercure
Sanigran *Mercoran* *Vérisan*	$SiO_4 (Hg - CH_2 - CH_2 - O - CH_3)_3$	Silicate de méthoxyéthylmercure
Solu-Sanigran (Mercoran et Verisan solubles)	$Cl - Hg - CH_2 - CH_2 - O - CH_3$	Chlorure de méthoxyéthylmercure

Panogen $NH = C(NH_2) - N = C = N - Hg - CH_3$ Methylmercure dicyandiamide

Certains composés synthétisés à l'étranger où ils connaissent une grande vogue, n'ont pas encore été commercialisés en France, c'est le cas pour le mercuriphenylcyanamide :

« *B - Carback - D* » $CN - NH - Hg - C_6H_5$

et surtout celui de la série des « puratized », largement répandue aux Etats-Unis ; leur formule chimique présente la particularité d'associer dans la même molécule un dérivé organo-mercurique et un ammonium quaternaire.

Puratized - N5X $(C_2H_4 - OH)_3 N(Hg - C_6H_5)(CO - CHOH - CH_3)$

Lactate de diphenylmercure triethanolamine.

La toxicité de la plupart de ces substances fongicides étant élevée, les législateurs ont dû les placer dans le tableau « A » des substances vénéneuses destinées à l'agriculture. (Arrêté interministériel du 15-11-1951).

LÉGISLATION des ORGANO-MERCURIQUES

Les dérogations apportées à la loi du 14 septembre 1916, interdisant l'emploi du mercure et de ses dérivés comme désinfectants agricoles, ne concernent que les organo-mercuriels. Les sels solubles d'acides minéraux et organiques demeurant interdits pour cet usage.

Les dérivés organo-mercuriques, dans lesquels « le mercure est lié par une au moins de ses valences à un atome de carbone d'un radical hydrocarbure » (4), ne doivent contenir ni mercure libre, ni mercure ionisable.

La proportion de mercure combiné entrant dans la composition des fongicides du commerce est limitée à 3 p. 100 pour ceux destinés au traitement à sec, à 4 p. 100 en ce qui concerne ceux utilisés en traitement humide. Leur présentation et leurs conditions de vente ont été minutieusement fixées par le décret du 11 mai 1937.

L'arrêté du 11 novembre 1948, complété par celui du 12 avril 1952 oblige les fabricants de ces fongicides à leur incorporer des substances colorantes ou odorantes distinées à « marquer » fortement les produits agricoles traités.

Selon la Loi du 2 novembre 1943, la vente et l'utilisation des organo-mercuriques est conditionnée par leur homologation préalable au Service de la Protection des végétaux. Le mode d'emploi et les doses usuelles y sont également enregistrées.

Les organo-mercuriques destinés à la désinfection des semences ont été inscrits dans le tableau « A » des substances vénéneuses destinées à l'industrie et à l'agriculture par l'arrêté du 15 novembre 1951 (1).

Conditionnement et étiquetage.

De ces décrets et lois successifs, il résulte pour le fabricant l'obligation de délivrer la spécialité dans des récipients étanches et résistants, agréés par le service de la Répression des Fraudes et portant un étiquetage normalisé constitué par :

a) - une étiquette rouge-orangé mentionnant :

— le nom et l'adresse du fabricant,
— la dénomination de la spécialité,
— le numéro de l'autorisation de vente (homologation),
— la composition chimique et la teneur en principe actif,
— le poids net ou le volume net de la préparation,
— les doses et modes d'emploi homologués,
— les précautions à prendre par les usagers ;

b) - une bande rouge-orangé portant, plusieurs fois inscrit, le mot « Poison », et des têtes de mort. Cette bande doit entourer complètement le récipient.

Détention.

Les spécialités du tableau « A » doivent être stockées dans leur emballage d'origine, dans des locaux spécialement réservés à cet usage, bien aérés et fermant à clé.

Il est interdit aux détaillants de transvaser ces produits ou de les fractionner pour les vendre.

Conditions d'application.

Les utilisateurs sont tenus de prendre les précautions suivantes :

— éviter le contact du produit toxique en utilisant des vêtements imperméables, des gants et des masques à poussières ;
— ne pas traiter sous le vent, ni fumer ;
— établir un roulement afin que le personnel ne reste pas plus d'une demi-journée sur ce travail ;
— lorsque ces opérations ont lieu en salle (désinfection de semences, par exemple) ; celle-ci doit être dotée d'appareils à dépression ou d'aspirateurs ;
— les appareils doivent être vidés et nettoyés sur les lieux du travail ;
— les produits résiduels et les emballages vides doivent être enfouis loin des sources et des puits ;
— les vêtements de travail doivent être nettoyés après l'emploi ;
— le personnel doit se laver soigneusement les mains et le visage à chaque arrêt de travail et avant les repas.

La circulaire ministérielle du 1er juillet 1947 concernant les produits agricoles désinfectés, mentionne que les semences ou plants traités ne doivent être détenus ou mis en circulation que renfermés dans des récipients portant une étiquette rouge-orangé indiquant la nature du produit et le désinfectant par lequel il a été traité.

Une contre-étiquette rouge-oranger doit porter le mot : « POISON ».

TOXICOLOGIE DES ORGANO-MERCURIQUES FONGICIDES

Le pouvoir fongicide de certains composés organo-mercuriques synthétisés est tel qu'il permet de les utiliser sous une forme très diluée. Ainsi dilués, ces composés ont une toxicité très inférieure à celle des sels solubles de mercure employés jusqu'alors pour cet usage.

Les législateurs ont pu alors apporter des dérogations au décret de septembre 1916 interdisant l'emploi du mercure pour la désinfection des graines.

A dose égale, les organo-mercuriques sont généralement moins toxiques que les sels de mercure. TILEMANS et DORMAL (13) attribuent au Solu-Sanigran une toxicité trois fois moins élevée que celle du chlorure mercurique.

WIEN (15) a comparé la toxicité du chlorure mercurique à celle du nitrate de phénylmercure en déterminant la dose de substance tuant la moitié des animaux auxquels elle est administrée. C'est la dose léthale à 50 p. 100 (DL 50).

En injection sous-cutanée chez la souris, la DL 50 donne les chiffres suivants :

— chlorure mercurique ..... 0,023 mg par g.
— nitrate de phénylmercure ..... 0,043 mg par g.

Ce dernier est donc environ deux fois moins toxique pour la souris que Cl2Hg.

SWENSSON (12) procède par injection intrapéritonéale chez la souris d'une solution aqueuse contenant 1 milligramme de principe actif par millilitre de solvant pour les organo-mercuriques, et de 0,40 mg. par ml. pour le chlorure mercurique.

Les doses tuant en un jour 50 p. 100 des souris mises en expérience, sont les suivantes :

— chlorure mercurique ..... 0,013 mg par g.
— chlorure de méthylmercure ..... 0,017 mg par g.
— acétate de phénylmercure ..... 0,019 mg par g.
— méthylmercure dicyandiamide .... 0,026 mg par g.

La différence entre les doses de chlorure mercurique et celles des composés organiques testés est encore plus sensible si l'on considère les doses amenant la mort de 50 p. 100 des souris en 7 jours :

— chlorure mercurique ..... 0,007 mg par g.
— chlorure de méthylmercure ..... 0,015 mg par g.
— acétate de phénylmercure ..... 0,013 mg par g.
— méthylmercure dicyandiamide .... 0,0185 mg par g.

Les organo-mercuriques dans lesquels le mercure n'est pas ionisé sont donc beaucoup moins toxiques que les sels mercuriques minéraux ou organiques.

Dautre part, il semble établi que les composés organo-mercuriques ne sont que très lentement transformés dans l'organisme (3). Dans ces conditions, l'intoxication même massive, par ces substances ne serait jamais traduite par les symptômes de l'intoxication mercurielle aiguë, mais par ceux de l'intoxication chronique : troubles digestifs très atténués ; douleurs gingivales, stomatite avec « liseré mercuriel ».

Des tremblements de la machoire peuvent se produire, s'étendant parfois aux mains et aux membres supérieurs ; ils peuvent même se manifester aux membres inférieurs.

Lorsque la dose ingérée est très forte, ou dans le cas d'intoxication chronique par absorption de doses cumulatives, des accidents rénaux peuvent avoir lieu, l'élimination urinaire se ralentit puis s'arrête, l'azotémie augmente, la néphrite peut entraîner la mort.

Cependant certains des organo-mercuriques employés comme fongicides peuvent provoquer une intoxication d'un genre très différent. Ce sont des composés liposolubles présentant une grande affinité pour les cellules nerveuses. L'intoxication se traduira par des troubles du système nerveux, troubles plus ou moins marqués selon l'importance de la dose de substance absorbée.

Les faibles doses provoquent des céphalées, les doses plus élevées conduisent à l'ataxie, à la parésie et même parfois à des crises de démence.

D'après ses expériences sur les souris, SWENSSON (12) indique que lorsqu'il injecte une dose juste inférieure à la DL 50, les phénomènes de parésie et d'ataxie apparaissent quelques minutes après l'injection et disparaissent après quelques heures.

Pour les doses faibles et répétées l'apparition de ces troubles peut être retardée. La période de latence peut atteindre deux mois dans le cas d'empoisonnement chronique.

Les substances liposolubles sont nombreuses dans la classe des alkylmercure, leur toxicité est toujours assez élevée. (C'est d'ail-

leurs en raison de sa toxicité particulièrement puissante que le diéthylmercure a dû être interdit en agriculture).

Ces substances liposolubles ingérées en faibles doses peuvent provoquer les mêmes lésions anatomo-pathologiques que les autres composés mercuriques, en particulier en ce qui concerne les reins que l'autopsie révèlera hypertrophiés, mous et tuméfiés, mais ils produisent en outre de graves lésions du système nerveux.

D'après HUNTER, BOMFORD et RUSSEL (6), les premiers éléments atteints sont les nerfs périphériques ainsi que les racines spinales de la moëlle, plus tardivement seront atteints les faisceaux postérieurs et la couche granuleuse du lobe médian du cervelet (cellules de Purkinge).

L'affinité des substances liposolubles pour le système nerveux central explique la prédominance des troubles nerveux. HUSGFN (7) montre que ceux-ci s'accumulent en quantité considérable dans le cerveau, ce qui n'est jamais le cas pour les sels minéraux de mercure ou les organo-mercuriques non liposolubles. Pour ces derniers, l'analyse révèle, après décès, un important dépôt de mercure dans les reins, un dépôt plus faible dans le foie et des traces seulement dans les intestins, la rate et les muscles.

LUNDGREN et SWENSSON (9) ont déterminé la quantité de mercure déposé dans différents organes prélevés lors de cas mortels d'empoisonnements par les alkymercure :

— reins : 304 gammas par 100 grammes
— foie : 1410 »
— cerveau : 340 à 970 »

SWENSSON, en utilisant le méthylmercure dicyandiamide en injection intra-veineuse chez le lapin, montre que, quel que soit le laps de temps s'écoulant entre l'injection et la mort (de 8 heures à 44 jours) le dépôt de mercure est important dans le cerveau.

Chez l'animal sacrifié 8 heures après l'injection, le dosage du mercure, par la méthode de Vesterberg et Sjöholm, donne les valeurs suivantes :

— cerveau : 135 gammas pour 100 grammes
— foie : 255 »
— reins : 330 »
— muscles : 75 »

Chez l'animal sacrifié quarante-quatre jours après l'injection, SWENSSON obtient les valeurs suivantes :

— cerveau : 105 gammas pour 100 grammes
— foie : 15 »
— reins : 80 »
— muscles : 50 »

La comparaison entre ces deux expériences montre que l'élimination du mercure est beaucoup plus lente pour le cerveau que pour les autres organes dans lesquels il peut se déposer.

L'importance du dépôt de mercure dans le cerveau et la lenteur de son élimination rendent dangereux pour l'utilisateur l'emploi de ces dérivés qui sont en outre souvent volatils.

TILEMANS indique, fort justement, que l'utilisateur devrait être instruit des risques causés par l'emploi de ces produits et être bien renseigné sur leurs antidotes et la conduite d'urgence à tenir en cas d'ingestion accidentelle de l'un de ces dérivés.

TRAITEMENT DES INTOXICATIONS

L'intoxication par les organo-mercuriques fongi ides est généralement une intoxication chronique due à l'absorption répétée de faibles doses de substances anti-cryptogamiques par des utilisateurs ne prenant pas suffisamment de précautions. Ces intoxications se produisent généralement par inhalation de composés volatils ou de ceux employés en saupoudrage à sec.

L'ingestion par voie buccale de doses plus importantes de fongicides, se produit plus rarement et de façon accidentelle.

Dans ce dernier cas, il faut d'abord essayer immédiatement de faire rejeter au patient le produit toxique absorbé. A défaut de l'administration d'un lavage d'estomac ou d'un émétique énergique TILEMANS indique que celle, répétée d'eau salée chaude, peut donner le même résultat.

Après ce traitement d'urgence, il pourra être administré à l'intoxiqué du charbon animal qui fixe en l'absorbant, une partie du composé mercurique ayant pénétré l'intestin ; une purge de sulfate de magnésie sera ensuite donnée.

Le même but est poursuivi par l'emploi d'eau albumineuse que FABRE (3) recommande de faire ingérer au patient selon la dose de 3 ou 4 blancs d'œufs battus dans 500 ml d'eau, quantité capable de neutraliser 30 cg. de chlorure mercurique. Il signale, par ailleurs, qu'une trop grande quantité de cet antidote serait inefficace, l'albuminate de mercure formé étant soluble dans un excès d'albumine.

Une cure de « rongalite » combinaison de formol et d'hydrosulfite de sodium, pourra compléter ce traitement. La rongalite est un réducteur, dépourvu de toxicité, « susceptible d'insolubiliser le mercure en le précipitant de ses combinaisons protéiques circulant dans l'organisme » (4). La rongalite est administrée en solution aqueuse par voie buccale.

Dans tous les cas d'hydrargyrisme nettement marqués, un traitement au « B.A.L. » (British Anti Lewisite) devra être prescrit ; le B.A.L., dimercapto-propanol, permet l'élimination des ions mer-

curiques en les captant à l'aide de ses groupements « SH ». Il est administré par voie intra-musculaire, en solution huileuse.

En plus de ces antidotes spécifiques, des médications complémentaires symptomatiques pourront être prescrites.

Le rétablissement de la diurèse sera favorisé par l'administration de tisanes, d'eau lactosée et de lavements de soluté isotonique de chlorure de sodium ou de glucose.

Dans le cas d'acidose des perfusions intra-veineuses de sérum salé ou bicarbonaté pourront être prescrites par le médecin traitant.

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES

Chapitre premier

INVESTIGATIONS PRÉLIMINAIRES

Nous avons mis en œuvre, dans nos expériences, diverses substances fongicides organo-mercuriques solubles (substances volatiles et non volatiles).

Ces principes seront, pour la commodité de l'exposé, désignés par les initiales représentant l'essentiel de leur constitution chimique.

M.M.D.D. = Méthyl Mercure Dicyan Diamide.

C.M.E.M. Chlorure de Methoxy Ethyl Mercure (de différentes origines désignées respectivement par les initiales de leur appellation commerciale : S, M et V).

Dans une première partie de nos recherches personnelles, nous allons envisager d'établir les bases expérimentales qui nous permettront de fixer approximativement les doses de substances anticryptogamiques à introduire dans la farine pour obtenir un pain totalement fongicide à l'égard de quatre champignons test :

Alternaria Solani (Ell. et Mart.)
Rhizopus Nigricans (Ehr.)
Aspergillus Flavus (Ik.)
Penicillium Roqueforti (Thom.)

L'on sait, en effet, que certains échantillons de pains prélevés à Pont-Saint-Esprit, broyés et humectés avec du milieu de Raulin, puis ensemencés concurremment au moyen de souches de ces quatre champignons, étaient caractérisés par un pouvoir inhibiteur total, c'est-à-dire qu'aucune des spores ensemencées ne pouvait germer (14).

Pratiquement, si l'on se souvient que le Penicillium Roqueforti représente, parmi les 4 micro-organismes, l'espèce la plus résistante aux substances fongicides organo-mercuriques, notre travail

se trouvait simplifié, car il nous imposait avant tout d'obtenir une farine, une pâte et un pain sur lesquels ne pouvait se développer le Penicillium Roqueforti.

A. — Protocoles expérimentaux.

Le problème ainsi posé a été abordé par la mise en œuvre de 3 techniques expérimentales.

Nous avons envisagé successivement de déterminer la dose de substance fongicide inhibant la germination des spores de Penicillium :

1° dans un milieu liquide (le milieu de Raulin) ;

2° dans un milieu solide constitué par la pâte ;

3° dans un substrat représenté par le pain.

a) *Détermination de la dose liminaire fongicide pour le Penicillium dans le milieu de Raulin* (*).

Nous devons d'abord préciser que les fongicides utilisés pour nos expériences sont des produits organo-mercuriques du commerce, hydrosolubles. Lorsque nous disons que nous appliquons une solution à 1 pour 1.000, nous voulons dire que c'est le produit commercial qui a été dilué à 1 pour 1.000. Nous sous-entendons, en outre, par ce terme, un gramme pour 1.000 millilitres d'eau distillée, en ce qui concerne les fongicides délivrés sous forme de poudre sèche, un millilitre pour les spécialités liquides.

La détermination de la dose liminaire fongicide, en milieu liquide, pour le Penicillium Roqueforti, a été effectuée selon la technique mise au point par Mme Deltort, dans ses travaux sur la « Normalisation d'un test biologique des substances fongicides », et perfectionnée par la suite (2).

Le milieu de culture est le liquide de Raulin neutre, dont nous utilisons, au départ, un extrait à double concentration qui sera dilué par la suite de moitié, soit par de l'eau distillée stérile, soit par une dilution aqueuse de principe fongicide.

(*) Notre choix s'est porté sur le milieu de Raulin neutre dont la formule est rappelée ci-après, car ce substrat s'avère le meilleur pour la culture des espèces saprophytes :

Eau	1500 g.
Sucre candi	70 g.
Tartrate neutre de K.	6,50 g.
Nitrate d'ammonium	4,50 g.
Phosphate de potassium	0,60 g.
Carbonate de magnésium	0,40 g.
Sulfate de potassium	0,25 g.
Sulfate de zinc	0,07 g.
Sulfate de fer	0,07 g.
Silicate de potassium	0,07 g.

L'expérience est conduite de la manière suivante : douze boîtes de Petri sont utilisées :

— 2 boîtes reçoivent les témoins (Raulin double et eau distillée) ;

— 2 jeux de 5 boîtes reçoivent le principe fongicide à diverses concentrations.

Nous utilisons au départ une solution-mère de la substance fongicide à partir de laquelle nous procédons à une série de dilutions en cascade.

Le volume total est calculé pour obtenir vingt millilitres de liquide.

	Raulin double	*Fongicide*	*Eau distillée*
Témoins	10 ml.	0 ml.	10 ml.
Boîtes d'expériences	10 ml.	x ml.	10-x ml.

On ensemence alors généreusement avec une colonie pure de Penicillium Roqueforti. Thom.

Souche de Penicillium :

Dans le but d'éviter la mise en œuvre de souches caractérisées par une fongicido-résistance acquise au cours de nombreuses expériences effectuées dans le laboratoire, nous avons utilisé au départ une souche neuve prélevée sur du fromage de Roquefort (Société).

Cette souche est régulièrement entretenue et repiquée sur milieu de Raulin gélosé (souche F.P.).

b) *Détermination de la dose liminaire fongicide sur un substrat solide : la pâte.*

Afin de nous placer dans des conditions expérimentales plus proches du but poursuivi, nous avons été amenés à modifier sensiblement le procédé et à choisir un milieu solide.

La pâte utilisée comme substrat est obtenue en additionnant cinq millilitres de liquide de Raulin à cinq grammes de farine.

Le fongicide est ajouté à la burette ; après homogénéisation, la pâte est ensemencée avec du Penicillium Roqueforti souche F.P.

c) *Détermination de la dose liminaire fongicide sur un substrat solide : le pain sec pulvérisé.*

Nous avons, par la suite, légèrement modifié le procédé en remplaçant la farine par du pain.

Dans une série de boîtes de Petri stériles, on introduit :

— 5 grammes de pain témoin sec pulvérisé ;

— 5 millilitres de milieu de Raulin sont ajoutés afin d'imbiber complètement le pain ;

— on ajoute le fongicide en quantité déterminée et, dans les boîtes-témoins, une égale quantité d'eau distillée.

Après une homogénéisation soigneuse, on ensemence avec Penicillium F.P.

Ce protocole expérimental est celui qui nous a donné les meilleurs résultats.

Il présente le double avantage d'offrir un milieu à peu près identique au pain fongicide que nous nous sommes promis d'obtenir et de conduire à des résultats constants.

B. — Résultats expérimentaux.

a) *En milieu liquide.*

En milieu liquide, *tous les fongicides étudiés se montrent efficaces à des doses relativement faibles.*

Les nombreuses cultures faites nous ont amené aux résultats exprimés dans le tableau suivant, dans lequel sont rapportées les doses liminaires fongicides de divers composés organo-mercuriques à l'égard de Penicillium Roqueforti (F.P.).

	M.M.D.D.	C.M.E.M.		
		S	M	V (*)
Doses liminaires	1/1300 (0,77 °/oo)	1/1300 (0,77 °/oo)	1/1050 (0,95 °/oo)	1/1050 (0,95 °/oo)

L'interprétation de ces résultats appelle une explication. Si on les compare avec les valeurs obtenues dans les expériences de Mme Deltort, on est frappé de leurs divergences. Nous avons pu acquérir la certitude que les souches utilisées par notre camarade n'avaient pas la même origine.

Notre souche, baptisée « F.P. », car celle utilisée par M. le Professeur Pellissier, dans l'étude du pain de Pont-Saint-Esprit, avait la même origine, est environ cinq fois moins résistante que celle utilisée par Mme Deltort.

Cette constatation est lourde de conséquences, car elle implique pour le chercheur l'obligation de s'en tenir à la race qu'il a utilisée au départ et l'incite à la plus grande prudence quant à la comparaison de ses propres résultats expérimentaux avec ceux obtenus par un autre chercheur.

(*) Les lettres S, M, V représentent l'initiale du produit commercialisé.

b) *En milieu solide : farine et Raulin.*

Sur ce milieu particulier, composé de farine et de liquide de Raulin, le Penicillium Roqueforti pousse mal ; les résultats obtenus à partir de ces cultures sont donc irréguliers ; une même concentration en principe fongicide n'ayant pas toujours la même action sur la germination du Penicillium.

En utilisant ce substrat, la détermination de la dose liminaire d'un fongicide pour le Penicillium ne peut être obtenue qu'en faisant la moyenne des résultats fournis par de nombreuses expériences.

Toutefois, les *concentrations en fongicide qu'il est nécessaire d'ajouter à la pâte, pour que se manifeste une forte action anticryptogamique, sont beaucoup plus élevés que celles qui inhibent la germination de Penicillium en milieu liquide.*

c) *En milieu solide : pain sec pulvérisé et Raulin.*

Ce substrat permettant un bon développement des cultures de Penicillium, *ne présente pas les anomalies signalées dans le cas du milieu précédent.* Il faut cependant signaler qu'après l'addition du principe fongicide, l'homogénéité, plus difficile à obtenir que dans le cas de la pâte, doit être réalisée avec soin.

L'acquisition la plus intéressante de ces expériences réside dans le fait que, pour inhiber le développement du Penicillium sur ces substrats solides, pâte ou pain, nous avons dû appliquer des doses massives de fongicide.

	M.M.D.D.	C.M.E.M.		
		S	M	V
Doses liminaires	2 %	2 %	3,5 %	3,5 %

Il était, au départ, imprévisible que la seule utilisation d'un milieu différent, le pain imprégné de Raulin, aux lieu et place du liquide de Raulin, exige, pour en arriver au même résultat (l'inhibition de la germination des spores de Penicillium), la mise en œuvre de concentrations vingt fois plus élevées.

Mais il est intéressant de constater que les différences se retrouvent avec les mêmes valeurs pour chacun des fongicides organo-mercuriels étudiés.

En résumé, ces recherches préliminaires qui étaient destinées à nous aiguiller vers l'estimation de la dose de substances fongicides qu'il était nécessaire d'introduire dans la pâte pour obtenir

un pain inhibant la germination et le développement du Pénicillium nous conduisent déjà à une acquisition des plus intéressantes.

Il est nécessaire d'appliquer une dose vingt fois plus concentrée dans ce milieu bien spécial que représente le pain.

Une question s'est alors posée : cette concentration en principe actif ne risque-t-elle pas d'inhiber aussi totalement la fermentation des levures que la germination des spores de Penicillium ? En d'autres termes, le pain réalisé avec une concentration en fongicide aussi élevée peut-il encore lever ?

Seule la fabrication d'un pain pouvait y répondre.

CHAPITRE II

ÉTUDE DE PAINS OBTENUS A PARTIR D'UNE PATE CONTENANT UN PRINCIPE FONGICIDE

En principe, les résultats exposés dans le chapitre précédent nous ont servi de base pour entreprendre la fabrication de pains dans lesquels le produit anticryptogamique introduit dans la pâte au cours du pétrissage doit, bien que leur permettant une levée normale, leur conférer un pouvoir fongicide total à l'égard des quatre champignons saprophytes choisis.

A. — TECHNIQUE DE FABRICATION

Notre technique de fabrication a nécessairement procédé par tatonnements. N'étant pas boulanger et ne pouvant nous permettre d'avoir recours à un homme de métier pour solliciter, d'une part sa technique, d'autre part son matériel et en particulier son four, nous avons été conduit à opérer avec les moyens du bord, c'est-à-dire à utiliser comme four une pâtissière-rotisseuse d'usage culinaire courant et à bénéficier des conseils qu'ont bien voulu nous apporter nos camarades de laboratoire et même... notre boulanger.

C'est la raison qui nous a incité, pour mettre au point notre technique, à préparer les pains témoins d'abord, les pains fongicides ensuite.

1° PAINS TÉMOINS.

Les pains témoins doivent bien lever et, mis en expérience suivant la technique précédemment exposée, permettre la germination des 4 champignons test, de l'Alternaria au Penicillium dans les mêmes conditions de temps, de température et d'humidité que les nombreux pains du commerce que nous avons étudiés.

a) *Confection de la pâte :*

A 200 gr. de farine on incorpore peu à peu, par pétrissage à la main sur une plaque de verre, 2 gr. de sel de cuisine en solution aqueuse et 2 gr. de levure de boulangerie fraîche en suspension dans l'eau.

La levure utilisée est achetée chez le boulanger à chaque expérience.

L'eau est ajoutée en quantité suffisante pour que la pâte devienne souple, mais reste cependant assez ferme.

b) *Levée.*

La pâte, disposée sur une couche de sciure de bois est mise dans une enceinte à 25° pour lui permettre de lever dans des conditions identiques quelle que soit la saison.

La pâte est recouverte de 2 ou 3 épaisseurs de papier filtre imbibé d'eau afin d'empêcher la surface de se dessécher.

On retire la pâte de l'étuve 5 heures après pour la placer rapidement dans le four.

c) *Cuisson.*

Le four est chauffé 10 minutes avant d'y placer la pâte, le four dont nous disposons ne conservant pas suffisamment sa chaleur nous maintenons le chauffage pendant les 30 minutes que dure la cuisson.

La température atteinte par les pains au cours de la cuisson est déterminée selon un protocole que nous exposerons à propos des pains fongicides.

2° Pains fongicides.

La fabrication des pains fongicides nous a posé quelques problèmes particuliers :

— Comment exprimer le pourcentage de fongicide à introduire dans la pâte ?

— Comment obtenir un pain fongicide blanc en utilisant un produit commercial coloré ?

a) *Mode d'expression du pourcentage de substance fongicide introduite dans le pain.*

Pour exprimer le pourcentage de produit fongicide du commerce introduit dans le pain, trois solutions se présentaient :

— la proportion d'anticryptogamique est calculée en fonction du poids total de la pâte (mélange farine et eau) ;

— elle est calculée en fonction du poids du pain frais, en fin de panification ;

— elle est rapportée au poids du pain après dessication.

Aucune de ces trois solutions ne nous a paru satisfaisante. En effet, on peut tenir pour variable la quantité d'eau nécessaire pour obtenir la pâte, par ailleurs, on ne peut affirmer avec certitude la teneur en eau du pain frais, enfin, le degré de dessication du pain sec est variable en fonction du temps et du degré hygrométrique.

Pour ces raisons, *nous avons donné notre préférence à la méthode qui consiste à calculer le pourcentage de fongicide incorporé à la pâte en fonction du poids de farine employée.*

b) *Obtention d'un pain blanc.*

Comment obtenir un pain fongicide blanc ?

On sait que par arrêté interministériel du 15 novembre 1951 les fongicides organo-mercuriques ont été classés dans le tableau « A » des substances vénéneuses destinées au commerce, à l'industrie et à l'agriculture.

En application de cette disposition, l'article 8 du Décret 48-1805 du 19 novembre 1948, modifié par le Décret 52-405 du 12 avril 1952 précise que ces substances ne peuvent être délivrées en nature, et qu'elle doivent être mélangées à des substances colorantes ou odorantes.

En d'autres termes, les produits organo-mercuriels ayant servi de base à notre expérimentation étaient nécessairement colorés.

Le but que nous nous étions primitivement fixé étant d'obtenir un pain fongicide blanc, nous avons été amenés à « décolorer » les fongicides étudiés.

En ce qui concerne le C.M.E.M.M. et le C.M.E.M.V. dont le principe actif est soluble dans l'eau et le colorant insoluble, le problème est facile à résoudre : il suffit de mettre le fongicide en suspension dans l'eau, le principe actif s'y dissout, en filtre pour obtenir un liquide presque incolore.

Il n'en est pas de même pour le M.M.D.D. et le C.M.E.M.S. En ce qui concerne le M.M.D.D. plusieurs essais nous ont montré que la méthode la plus efficace est l'adsorption du colorant par le charbon animal ; mais pour effectuer une décoloration complète il faut employer une assez grande quantité de charbon.

La solution -mère de M.M.D.D. versée dans un verre à pied, est additionné de 1/5e de son poids de noir animal. Après quelques minutes d'agitation le charbon se dépose, laissant apparaître à la partie supérieure du verre une frange de liquide incolore ; on peut alors filtrer.

Malheureusement nous avons été conduits à abandonner ce procédé. En effet, une appréciable quantité de principe actif est adsorbée par le charbon animal en plus du colorant, de sorte qu'il nous est impossible de décerner une valeur exacte à la proportion de fongicide ajoutée.

C'est donc le principe fongicide et son colorant, c'est-à-dire le produit commercial qui est incorporé à la pâte.

La présence de ce colorant ne gêne d'ailleurs pas la panification et nous avons l'avantage d'avoir un pain toxique « marqué ».

c) *Incorporation du fongicide à la pâte.*

L'incorporation du fongicide à la pâte a lieu immédiatement après celle de la levure et du sel de cuisine, avant que toute l'eau nécessaire ne soit ajoutée. Le mélange doit être très homogène ; il y a lieu de souligner que le contrôle de l'homogénéité est facilité par l'emploi des fongicides commerciaux non décolorés.

Les spécialités délivrées dans le commerce en poudres sèches (C.M.E.M. S,M,V.) sont pesées, le M.M.D.D. fourni sous forme liquide est mesuré avec une burette.

Afin de ne pas risquer d'être intoxiqué par ces composés organo-mercuriques nous mettons des gants de caoutchouc pour pétrir la pâte et manipulons sous une hotte.

d) *Fermentation panaire.*

Les expériences suivantes ont eu pour but de déterminer jusqu'à quel point la levure de boulangerie résistait mieux aux fongicides organo-mercuriques que les moisissures banales ; puis nous avons étudié le comportement de ces Saccharomyces ensemencés dans un milieu nutritif contenant une dose de fongicide insuffisante pour inhiber totalement son développement.

Ces expériences ont été réalisées dans les conditions suivantes:

— 19 ml de moût de bière contenus dans un tube à essai sont additionnés de

— 1 ml. de suspension de levure de boulangerie, et de

— 1 ml. de dilution du fongicide.

Le moût de bière, fourni par une brasserie, est stérilisé à l'autoclave et conservé au frigidaire.

La levure de boulangerie est toujours employée fraîche. Les suspensions utilisées pour ces expériences sont réalisées extemporanément avec un gramme de levure du commerce et 10 ml. de moût.

Les dilutions de principe fongicide varient avec chacun des tubes à essais mis en expérience. Elles sont calculées de telle sorte que, ajoutées dans chaque tube sous un volume de 1ml., elles confèrent aux 20 ml. de liquide finalement obtenus, une concentration s'échelonnant de 0,1 à 1 p. 100.

Les tubes à essais sont alors placés dans une enceinte à 25°.

Dans ces expériences, où le principe fongicide employé est le M.M.D.D., toute manifestation de fermentation est inhibée à partir

d'une concentration en produit commercial de 0,4 p. 100. L'expérimentation, répétée trois fois, nous donne toujours 0,4 p. 100 comme dose liminaire fongicide du M.M.D.D. envers Saccharomyces Ellipsoideus.

Les concentrations inférieures à 0,1 p. 100 permettent une fermentation alcoolique que nous avons essayé de comparer à celle ayant lieu dans un tube témoin sans fongicide. L'intensité de la fermentation a été appréciée par la mesure effectuée toutes les 30 minutes, du volume de gaz carbonique recueilli par la cloche graduée.

Ces expériences ont été réalisées avec une concentration en M.M.D.D. de 0,1 p. 100, dose légèrement supérieure à celle nécessaire pour inhiber la germination des spores de Penicillium Roqueforti ensemencés sur un substrat liquide.

Nous avons pu observer que :

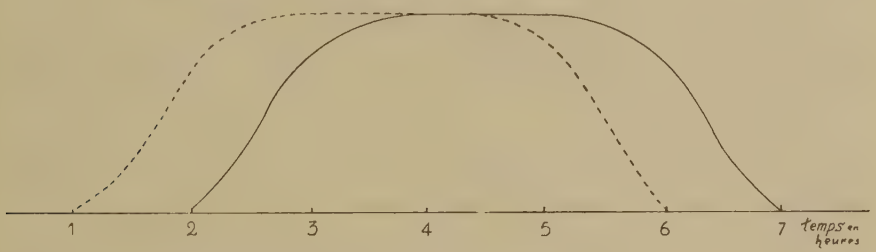
1° dans les tubes témoins ne contenant pas de M.M.D.D. le dégagement de gaz carbonique se produit une heure environ après qu'ils aient été ensemencés et mis dans l'enceinte isotherme. Ce dégagement dure en moyenne 5 heures.

2° dans les tubes contenant 0,1 p. 100 de M.M.D.D. le temps de latence précédant le dégagement de gaz carbonique atteint 2 heures, mais ce dégagement présente la même intensité et dure autant (5 heures) que dans les tubes témoins.

Au cours de l'expérience, les volumes de gaz carbonique dégagés ayant été notés toutes les 30 minutes, nous avons pu tracer une courbe pour chaque catégorie de fermentation :

— une courbe pour la fermentation en moût de bière pur,

— une autre pour la fermentation de la levure de boulangerie dans un moût additionné de 0,1 p. 100 de M.M.D.D.



— Pointillé : **Courbe de la fermentation en tubes-témoins.**

— Trait plein : **Courbe de la fermentation en milieu M.M.D.D. 0,1 %.**

— Abcisse : **Temps en heures.**

— Ordonnées : **Volume de gaz carbonique apprécié en ml. par unité de temps.**

Dans le cas de doses supérieures à 0,1 p. 100 le temps de latence est augmenté mais une fermentation intense a cependant lieu jusqu'à une concentration assez voisine de la dose liminaire fongicide, la fermentation n'est fortement freinée qu'à partir d'une concentration en M.M.D.D. de 0,3 p. 100.

Pour conclure, *ces expériences montrent que, dans le cas où une concentration en principe fongicide nettement inférieure à la dose liminaire pour les levures* (0,4 p. 100 pour la levure de boulangerie ensemencée dans du moût de bière) *est appliquée, la fermentation* se produit en présentant un caractère particulier : elle *débute et se termine avec un retard plus ou moins accusé mais en fin de fermentation la quantité de gaz carbonique dégagé est du même ordre que dans les expériences témoins.*

Ce principe subit une application dans le cadre de la fermentation panaire. Pour que la levée des pains additionnés de substances fongicides soit comparable à celle des pains témoins, il c'st nécessaire de maintenir la pâte dans l'étuve une au deux heures de plus.

e) *Cuisson.*

La cuisson des pains additionnés de M.M.D.D. nous a conduit à une vérification supplémentaire.

En effet, la température de la mie des pains déjà réalisés a toujours été, à la sortie du four de 95° ou 96° et le principe actif de ce fongicide est très volatil (qualité qui lui a valu des intoxications parfois mortelles). (*)

La cuisson pourrait donc chasser du pain une partie du M.M.D.D.

Cette éventualité nous a conduit à comparer, pour chaque pain réalisé, le pouvoir fongicide de la pâte avec celui du pain obtenu par cuisson de celle-ci.

B. — ETUDE DU POUVOIR FONGICIDE DES PAINS OBTENUS A PARTIR D'UNE PATE CONTENANT UN PRINCIPE ORGANO-MERCURIQUE

L'évaluation du pouvoir fongicide a été systématiquement effectuée *sur la pâte puis sur le pain ;* mais *dans ce dernier cas les échantillons ont été testés immédiatement après leur fabrication, puis au cours de leur vieillissement* à intervalles plus ou moins réguliers, au cours d'une période s'étendant sur plus de deux années.

(*) Cette acquisition nous a incité à procéder à des vérifications et il nous est agréable de remercier ici M. BALMA qui a bien voulu, chez un boulanger de ses parents, faire des mesures de température sur pains de différentes tailles. Ces expériences ayant porté sur plusieurs fournées nous ont confirmé que la température interne des pains était de l'ordre de 95°. Ce que ne semblent pas accepter les ouvrages classiques qui estiment à 80° la température maxima atteinte par la mie.

a) *Technique de détermination du pouvoir fongicide de la pâte.*

La pâte fongicide pétrie, une petit quantité (5 ou 6 gr.) en est prélevée avant la mise à l'étuve.

Par ailleurs une pâte témoin est préparée avec la même farine, pétrie dans les mêmes conditions mais sans fongicides. Elle est destinée à l'obtention d'un pain témoin. Une petite quantité de cette pâte est également prélevée.

On dispose la pâte fongicide dans 3 boîtes de Pétri stériles, à raison de 2 gr. par boîte environ.

On ensemence généreusement en surface avec Penicillium Roqueforti souche F.P.

Trois autres boîtres de Pétri sont garnies de la même manière par la pâte témoin et ensemencées.

On retrouve dans cette technique les inconvénients déjà signalés lors des essais préliminaires, mais la nécessité d'obtenir un résultat nous oblige à multiplier les épreuves.

b) *Technique de détermination du pouvoir fongicide du pain.*

Les expériences destinées à tester le pouvoir fongicide du pain obtenu sont mises en train dès la sortie du four après que la température de la mie ait été notée.

Toutes les cultures sont effectuées sur la mie. Chaque pain fait l'objet de deux expériences confrontées avec deux autres conduites sur pain témoin.

— 2 gr. de pain sont placés dans une boîte de Pétri stérile ;

— 1 ml. de milieu de Raulin double, neutre et stérile, est nécessaire pour l'imbiber complètement.

— On ensemence avec le Penicillium Roqueforti souche F.P.

La lecture se fait dès le surlendemain pour les témoins. Des retards de germination de 6 à 8 jours ont pu être notés pour des pains contenant une concentration en principe fongicide proche de la dose liminaire. Dans ces conditions il est nécessaire de lutter contre l'évaporation en ajoutant de l'eau distillée stérile tous les 4 jours environ.

C: — RESULTATS EXPERIMENTAUX

Les résultats de nos essais préliminaires semblent indiquer que les doses de principe actif à introduire dans la pâte pour obtenir un pain fongicide à l'égard des champignons saprophytes et en particulier de Penicillium Roqueforti, sont les suivantes :

M.M.D.D.	2 p. 100
C.M.E.M. S.	2 p. 100
C.M.E.M. M.	3,5 p. 100
C.M.E.M. V.	3,5 p. 100

Si l'on sait que la levure est plus résistante à l'action des fongicides que le Penicillium, ces pains doivent pouvoir lever normalement car les concentrations appliquées sont « juste » suffisantes pour inhiber les spores de Penicillium Roqueforti et inefficaces pour entraîner une fongostase notable des Saccharomyces.

Les pains réalisés, nous notons systématiquement la température interne, la qualité de la levée et le pouvoir fongicide.

— La température est mesurée en plongeant le réservoir d'un thermomètre à l'intérieur du pain sortant du four.

— La levée est évaluée d'après le volume moyen des alvéoles et le volume apparent du pain en fonction du poids, c'est-à-dire sa densité.

— Le pouvoir fongicide est apprécié en fonction du développement du Penicillium (*). Nous notons le temps mis par les spores de Penicillium pour donner une colonie filamenteuse visible à l'œil nu ; ce que nous avons appelé « temps de germination ».

1° Fongicide commercial décoloré.

Le M.M.D.D. décoloré au noir animal a été appliqué à des concentrations croissantes, variant de 2 à 10 p. 100. Après leur cuisson tous les pains réalisés, ensemencés après imbibition de milieu de Raulin, ont permis la germination des spores de Penicillium Roqueforti souche F.P. sans qu'il soit possible de constater un effet rigoureusement proportionnel à la dose employée ; c'est ce qui ressort du tableau suivant :

Concentration en fongicide	*Température*	*Levée*	*Temps de germination*
2 p. 100	96°	normale	2 jours
4 p. 100	95° 5	normale	2 jours
5 p. 100	95°	normale	4 jours
10 p. 100	95°	normale	4 jours

Par ailleurs, la pâte de ces pains prélevés avant la cuisson ne s'est pas montrée fongicide vis-à-vis du Penicillium.

Enfin, les cultures faites parallèlement sur pains témoins additionnés de M.M.D.D. décolorés aux concentrations précitées, ont également permis la pousse du Penicillium Roqueforti.

(*) Rappelons que le Penicillium Roqueforti est le plus résistant des quatre champignons testés ; en d'autres termes, les autres champignons ne peuvent se développer si le Penicillium est inhibé.

Il est donc établi que le noir animal adsorbe, outre le colorant du M.M.D.D., une forte proportion du principe actif fongicide.

Il n'est pas possible, dans ces conditions, de calculer ou d'estimer la dose de fongicide effectivement appliquée après décoloration par le noir animal. Nous avons dû abandonner cette méthode.

C'est la raison qui nous a incité, par la suite, à fabriquer du pain avec du M.M.D.D. non décoloré. Ce procédé ayant, par ailleurs, l'avantage de « marquer » les pains ainsi obtenus d'un indicateur permettant d'attirer notre attention et d'éveiller notre prudence.

2° Fongicides commerciaux non décolorés.

Résulats obtenus avec les fongicides non décolorés :

Il importe, ici, de préciser que, dans le but de nous placer dans des conditions proches de celles réalisées dans la pratique boulangère, un temps de levée de 5 heures est fixé pour tous les pains.

Lorsque nous disons que la levée est normale, ce phénomène est traduit par l'aspect du pain, identique aux pains témoins du point de vue volume moyen des alvéoles et volume apparent du pain.

Lorsque nous disons que la levée est mauvaise, ce phénomène est traduit par des alvéoles plus petites et un volume de la masse (après cuisson) plus réduit que dans le pain sans fongicide.

Enfin, dans le cas où nous disons que la levée est très mauvaise, cela signifie que la fermentation panaire a été à peine ébauchée.

En d'autres termes, et c'est une notion sur laquelle nous insistons, *il y a un retard plus ou moins accusé de la fermentation panaire,* mais si l'on y mettait le temps nécessaire, la mie présenterait les mêmes qualités que dans un pain normal (à la condition de ne pas dépasser exagérément la dose liminaire fongicide pour le Penicillium).

Les résultats expérimentaux, obtenus *in vitro,* par l'action des fongicides sur la levure de boulangerie agissant en moût de bière (exposés pp. 44 à 46), montrent que *ces substances sont, à certaines doses, fongostatiques mais non fongicides,* pour Saccharomyces Ellipsoïdeus.

a) *Pains réalisés avec des fongicides organo-mercuriques non volatils.*

Ces pains nous ont permis d'établir les résultats exposés dans le tableau ci-dessous, dans lequel les concentrations appliquées sont de 2 p. 100 :

Fongicides utilisés	*Titre en principe actif*	*Température de la mie*	*Appréciation de la levée*	*Temps de germination*
C.M.E.M. S	2 p. 100	96°	mauvaise	pas de germination
C.M.E.M. M	2 p. 100	95°	mauvaise	7 jours
C.M.E.M. V	2 p. 100	96°	mauvaise	7 jours

Ces résultats sont ceux que nous avions prévus :

— la levée est mauvaise, car le temps passé à l'étuve n'était pas suffisant pour permettre une fermentation panaire comparable à celle du pain témoin ;

— la dose de C.M.E.M.S. incorporée à la pâte lui confère ainsi qu'au pain qu'elle donnera, une action fongicide totale sur Penicillium Roqueforti.

En ce qui concerne le C.M.E.M.M. et le C.M.E.M.V., la dose liminaire fongicide envers le Penicillium est un peu supérieure à 2 p. 100, comme le faisaient prévoir nos essais préliminaires, mais le fait que les spores de Penicillium n'ont pu germer qu'après 7 jours de latence, montre que cette dose est voisine de celle employée.

b) *Pains réalisés avec un fongicide volatil : le M.M.D.D.*

Les pains réalisés avec des concentrations en M.M.D.D. de 0,5 - 1 et 2 p. 100, ne présentent d'action fongicide qu'envers les spores de Rhizopus, Alternaria et Aspergillus. Les spores de Penicillium germent avec un certain retard par rapport aux témoins (2 jours pour les pains pétris avec 2 p. 100 de M.M.D.D.).

Nous avons alors fait d'autres pains en augmentant la concentration en principe actif jusqu'à l'obtention d'un substrat inhibant totalement le développement du Penicillium Roqueforti.

Le tableau ci-dessous résume les résultats fournis par ces pains :

Titre en M.M.D.D.	*Température*	*Appréciation de la levée*	*Temps de germination des spores de P.R.*
0,5 p. 100	95°	normale	2 jours
1 p. 100	95°	normale	2 jours
2 p. 100	96°	mauvaise	4 jours
3 p. 100	95°	très mauvaise	4 jours
4 p. 100	95° 5	nulle	6 jours
5 p. 100	96°	nulle	les spores ne germent pas

Pour obtenir un pain fongicide envers le Penicillium, avec le M.M.D.D., il a été nécessaire d'en incorporer 5 p. 100. Mais une telle dose est suffisante pour inhiber la multiplication de la levure, le pain n'a pas levé.

Contrairement à ce que nous avions prévu, *il semble impossible d'obtenir avec le M.M.D.D., c'est-à-dire un fongicide organomercurique volatil, un pain qui, à l'état frais, est à la fois caractérisé par une levée normale et un pouvoir fongicide total pour notre Penicillium.*

Il semble, à première vue, évident que *ce résultat est dû à la volatilité du M.M.D.D.*

En effet les pâtes pétries avec 2 ou 3 ml. de M.M.D.D. (3 %) pour 100 gr. de farine empêchent toujours le développement du Penicillium ; or le pain obtenu après cuisson de cette pâte permet la germination des spores en 4 jours.

Dans le cas où une dose de M.M.D.D. de 4 % a été incorporée à la pâte, celle-ci ne lève pas : la concentration en fongicide a donc atteint la dose liminaire à l'égard de la levure de boulangerie ; cependant, une fois sorti du four, le pain obtenu laisse germer les spores du micro-organisme saprophyte.

C'est l'évolution dans le temps du pouvoir fongicide de ces pains qui nous a fait rejeter cette hypothèse en révélant un fait nouveau : au cours de la conservation le pouvoir fongicide de ces pains n'est pas stable, il augmente.

D. — PERSISTANCE DU PRINCIPE ACTIF ET EVOLUTION DU POUVOIR FONGICIDE

1° Mise en évidence de l'augmentation du pouvoir fongicide avec le vieillissement.

Tous les pains réalisés sont conservés à l'abri de la lumière, de la chaleur et de l'humidité dans des sacs de cellophane aérés.

Après un vieillissement de plusieurs mois, nous avons eu la surprise de constater que le pouvoir fongicide des pains contenant du M.M.D.D. volatil avait augmenté. Cette augmentation de l'action fongicide n'est décelée, après une nouvelle série de tests réalisés sur l'ensemble des pains pétris, que dans le cas des pains cuits avec le M.M.D.D. Les pains contenant les 3 autres fongicides (C.M.E.M. S, C.M.E.M. M et C.M.E.M. V) non volatils conservent sur le Penicillium la même action qu'ils présentaient à leur sortie du four.

Dans le cas des pains contenant du M.M.D.D. la dose liminaire léthale pour Penicillium qui était de 5 p. 100 sur l'échantillon frais, est de 4 p. 100 au 3^me^ mois de vieillissement et tombe à 2 p. 100 à partir du 4^me^ mois.

Après 3 années de conservation les pains à 2 p. 100 sont toujours fongicides à l'égard du Penicillium.

Nous avons contrôlé ces résultats avec ceux obtenus dans une expérience où sont confrontés dans leur pouvoir fongicide des pains de titre en M.M.D.D. et d'âges différents. Ces cultures étant faites simultanément attestent que la souche de Penicililum Roqueforti employée est la même dans toutes les boîtes de Petri et que les conditions de température et d'humidité sont identiques pour tous les milieux ensemencés.

Titre en M.M.D.D.	*Caractère de la levée*	*« Age » des pains*	*Action sur Penicillium R.*	
			Effet fongicide	*Effet fongostatique* (retard de germ.)
		frais	néant	néant
1 p. 100	normale	4 mois	néant	léger
2 p. 100	mauvaise	frais	néant	léger
		4 mois	positif	
3 p. 100	très mauvaise	frais	néant	léger
		4 mois	positif	
4 p. 100	nulle	frais	néant	important
		4 mois	positif	
5 p. 100	nulle	frais	positif	
		4 mois	positif	

Parmi les échantillons à 2 p. 100 le pain frais est légèrement fongostatique, le pain de 4 mois est totalement fongicide pour le Penicillium.

Le pouvoir fongicide des pains réalisés avec le M.M.D.D. augmente donc avec le temps dans de notables proportions : *en 4 mois la dose liminaire fongicide est ramenée de 5 à 2 p. 100.*

Il faut donc environ 4 mois pour que le pouvoir fongicide atteigne sa valeur maximum ; au-delà de ce temps, le pain est stabilisé.

En conclusion,

Dans le cas où une farine polluée par un fongicide organo-mercurique volatil (comme le M.M.D.D.) est utilisée en panification, l'action fongicide non décelable sur le pain frais (au titre de 2 p. 100 dans le cas du fongicide étudié) se manifeste nettement après un vieillissement de 4 mois.

Ce phénomène est constant, les nombreuses expériences réalisées nous ont permis de le vérifier systématiquement. Dans le chapitre suivant, nous tenterons d'en donner une explication satisfaisante.

2° Interprétation possible de la variation du pouvoir fongicide.

Les expériences précédemment rapportées nous ont montré l'augmentation du pouvoir fongicide des pains au cours de leur vieillissement.

En réalité, le problème de la variation de l'action fongicide des pains contenant du M.M.D.D. doit être abordé différemment. *Tout se passe comme si*, dans un premier temps, *au cours de la fabrication des pains, le pouvoir fongicide diminuait brusquement après la cuisson, puis dans un deuxième temps, remontait au cours de la conservation.*

Les expériences préliminaires avaient établi qu'une concentration de 2 p. 100 en M.M.D.D. était nécessaire pour inhiber totalement la germination de Penicillium Roqueforti, mais nous avons vu qu'il fallait atteindre la proportion de 5 ml. de solution commerciale pour 100 gr. de farine pour obtenir un pain frais fongicide à l'égard de ce micro-organisme. Ce n'est que 4 mois après leur cuisson que les pains contenant 2 p. 100 de M.M.D.D. se révèlent fongicides à l'égard du Penicillium.

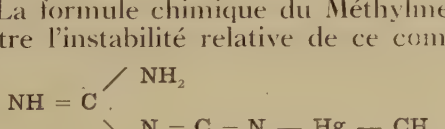
a) *Instabilité du Méthylmercure Dicyandiamide* (M.M.D.D.)

Notre hypothèse de départ consiste à admettre que *le mercure n'a pas été chassé du milieu* sous l'action de la chaleur dégagée au cours de la cuisson.

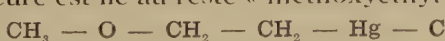
On peut admettre comme vraisemblable en effet que, malgré la température minimum de 95° atteinte dans le four, malgré la volatilité connue du M.M.D.D. ce principe intimement mélangé à la pâte au cours du pétrissage, a été retenu lors de la cuisson. Pendant cette opération, la pâte se transforme, devient un milieu alvéolé, comparable à une éponge : il est incontestable que le pain ainsi obtenu est relativement perméable aux gaz. Admettre la conservation intégrale du principe organo-mercurique est difficile à accepter.

La cuisson provoquerait le transfert du mercure de sa copule organique initiale sur certains groupements fonctionnels des protéïnes du gluten, qui sont, de tous les composants du pain, ceux qui ont le plus de possibilités de fixer le mercure.

La formule chimique du Méthylmercure Dicyandiamide nous montre l'instabilité relative de ce composé organo-mercurique.



Le mercure est relié au reste de la molécule organique par l'intermédiaire d'un atome d'azote, liaison plus fragile que celle existant dans le chlorure de méthoxyéthylmercure, C.M.E.M. où le mercure est lié au reste « methoxyéthyl » par un atome de carbone.



Par ailleurs, les trois doubles liaisons sont autant de points de rupture possible de la molécule de M.M.D.D.

La température de 95° à laquelle est soumis ce composé organo-mercurique pendant les 30 minutes que dure la cuisson peut entraîner, en grande partie, sa dégradation. Le mercure libéré peut-il alors être transféré sur les protéïnes constitutives du pain ? C'est ce que nous avons cherché à vérifier par l'expérience suivante, consistant à étudier la fixation des ions mercuriques sur les protéïnes du sérum sanguin.

b) *Fixation des ions mercuriques sur les protéïnes sériques.*

Pour démontrer la possibilité de fixation du mercure sur les protéïnes, nous avons réalisé sur le sérum sanguin l'expérience décrite ci-après.

Dans un sac de collodion surmonté d'une tige de verre, nous avons versé du sérum sanguin additionné de 0,1 % de chlorure mercurique et nous avons dialysé contre de l'eau distillée en immergeant le sac dans un cristallisoir.

Le sac de collodion contient :

— 90 ml. de sérum sanguin
— 10 ml. de solution de $HgCl_2$ à 1 p. 100.

Le cristallisoir contient 380 ml. d'eau distillée.

L'eau de dialyse est changée toutes les 12 heures ; 48 heures après la mise en train de l'expérience, on recueille le sérum auquel on ajoute 6 gr. p. 1000 de chlorure de sodium afin de dissoudre le précipité de globuline.

Les 5 eaux de dialyse recueillies sont concentrées sous vide et ajustées à 50 ml.

La concentration de chlorure mercurique employée (0,1 p. 100) est choisie de telle sorte qu'elle ne risque pas de dénaturer les protéïnes du sérum (précipitation non réversible) mais qu'elle possède une action fongicide suffisante pour qu'il soit possible de la déceler dans les liquides résiduels de l'expérience par simple mise en culture du Penicillium Roqueforti.

Au cours de la dialyse, les sels minéraux et autres cristalloïdes passent dans l'eau distillée. Ce sera le cas du mercure s'il n'est pas fixé par les protéïnes non dialysables du sac de collodion.

Recherche du pouvoir fongicide dans les eaux de dialyse.

Protocole expérimental.

Les expériences sur les eaux de dialyse ont été confrontées avec des expériences témoins dans lesquelles le liquide de dialyse est remplacé par de l'eau distillée.

Dans une série de boîtes de Pétri stériles sont versés :

Pour l'essai témoin :

10 ml. d'eau distillée
10 ml. de milieu de Raulin à double concentration.

Pour les essais sur les eaux de dialyse :

10 ml. d'eau de dialyse
10 ml. de milieu de Raulin double.

On ensemence en surface avec du Penicillium.

Résultats :

	Témoin	*EAUX DE DIALYSE*				
		1re eau	2me eau	3me eau	4me eau	5me eau
Temps de germination	2 j.	6 j.	2 j.	2 j.	2 j.	2 j.

Légende : seule la 1re eau de dialyse possède un pouvoir fongicide appréciable.

Les quatre dernières eaux de dialyse se comportent, vis à vis de Penicillium Roqueforti comme l'essai témoin, c'est-à-dire comme si elles ne contenaient pas d'ions mercuriques. Par contre, la *première eau de dialyse* ne permettant la pousse du Penicillium qu'après 6 jours de latence, *contient une appréciable quantité de fongicide.*

Recherche du pouvoir fongicide dans le sérum dialysé.

Protocole expérimental.

Les expériences sur sérum dialysé ont été confrontées avec des expériences témoins dans lesquelles le sérum dialysé était remplacé par le sérum pur utilisé au départ, c'est-à-dire sans chlorure mercurique et non dialysé.

Pour l'essai témoin :

— 10 ml. de sérum pur
— 10 ml. de milieu de Raulin double.

Pour les essais sur sérum dialysé :

— 10 ml.de sérum additionné de Cl2Hg puis dialysé,
— 10 ml. de Raulin double.

On ensemence avec Penicillium Roqueforti.

Résultats :

	Témoin	*Sérum dialysé*
Temps de germination	2 jours	4 jours

Légende : Le sérum dialysé est fongicide.

Le retard de 4 jours observé pour la germination des spores de Penicillium ensemencés sur le sérum dialysé révèle la *présence certaine d'un principe fongicide qui n'existe pas dans le sérum pur.*

Si nous comparons les résultats obtenus dans le cas, d'une part, de la première eau de dialyse, de l'autre, de la culture sur sérum dialysé, nous constatons que le retard de germination est plus grand c'est-à-dire l'action fongicide plus forte dans le cas de la première eau de dialyse.

Le sérum a donc fixé une partie des ions mercuriques, mais une quantité plus importante a dialysé.

Par la suite le protocole expérimental a été modifié de telle sorte que le temps de contact entre le chlorure mercurique et les protéïnes soit prolongé et surtout afin de pouvoir ajouter au sérum une plus grande quantité d'ions mercuriques sans risquer de dénaturer les protéïnes qu'il contient (les protéïnes une fois précipitées, il ne nous serait plus possible de tester leur action fongicide selon la méthode que nous employons).

Comme dans l'expérience précédente le sac de collodion est rempli de sérum sanguin additionné de 0,1 p. 100 de chlorure mercurique et on dialyse contre de l'eau distillée ; mais à chaque échange de l'eau de dialyse du cristallisoir contre de l'eau distillée stérile (toutes les 24 heures) 1 ml. de solution de Cl_2Hg à 1 p. 100 est ajouté au sérum dans le sac de collodion.

Nous avons au départ dans le sac hémi-perméable :

72 ml. de sérum pur
8 ml. de solution de Cl_2Hg à 1 p. 100.

On ajoute chaque jour 1 ml. de solution de chlorure mercurique à 1 p. 100 pendant les 8 jours que dure l'expérience, soit en tout 8 ml. de la solution.

Les eaux de dialyse et le sérum sont traités et mis en culture comme précédemment.

Résultats des cultures faites avec les 9 eaux de dialyse :

	TÉMOIN	*EAUX DE DIALYSE*								
		Première	Deux.	Trois.	Quat.	Cinq.	Sixième	Septième	Huitième	Neuv.
Temps de germination	2 j.	6 j.	2 j.	2 j.	2 j.	2 j.	2 j.	2 j.	2 j.	2 j.

Légende : la première eau de dialyse possède un pouvoir fongicide évident.

Cette fois encore, *seule la première eau de dialyse présente une action fongicide* (ou plutôt fongostatique) et cette action n'est

traduite que par un simple retard de germination des spores de Penicillium Roqueforti.

Résultat des cultures sur sérum dialysé.

Mis en culture dans les mêmes conditions, *le sérum dialysé se montre totalement fongicide à l'égard du Penicillium ;* les boîtes de Petri ensemencées restent stériles, alors que seule la première eau de dialyse manifeste une faible action fongicide en ne permettant la germination du micro-organisme ensemencé qu'avec un retard de 4 jours par rapport au témoin (le même retard que dans notre première expérience).

Le renouvellement des ions mercuriques entre les dialyses a augmenté le pouvoir fongicide final du sérum. Ce dernier a donc fixé plus de mercure que précédemment.

En conclusion :

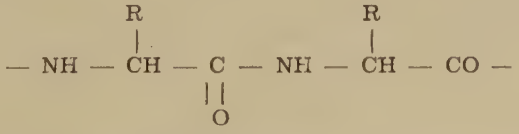
Ces expériences démontrent que les protéines du sérum sont capables de fixer du mercure, c'est-à-dire que des combinaisons chimiques peuvent exister entre ions mercuriques et elles.

Nous pouvons penser que des combinaisons semblables peuvent se produire dans le pain, entre le gluten et le mercure provenant de la dégradation du M.M.D.D. par la chaleur.

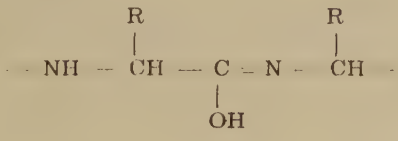
On sait que les protéines sont formées de chaînes d'acides aminés reliés entre eux par des liaison peptidiques, le groupement acide de l'un d'eux étant uni au groupement aminé de l'autre. Certains de ces acides aminés, grâce aux radicaux libres qu'ils possèdent, sont capables de fixer les ions mercuriques.

Ceci est d'ailleurs possible au niveau de la liaison peptidique elle-même sous sa forme imide.

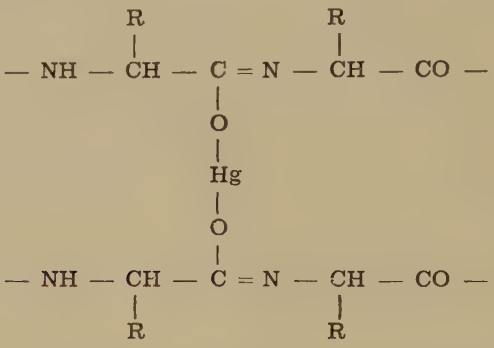
ou



Cette forme « imide » est en équilibre, par migration de l'atome d'hydrogène de « - NH - » sur le groupement « - CO - », avec la forme « imino-alcool » :

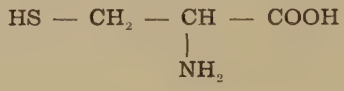


Sous cette forme, la liaison peptidique peut fixer le mercure. Un ion « Hg » étant relié à deux fonctions « imino-alcools » selon le schéma suivant :

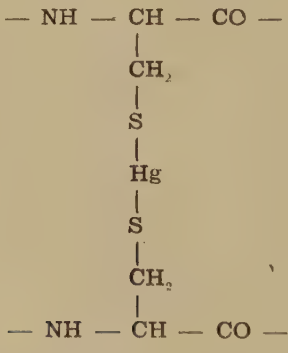


Parmi les possibilités de fixation des ions mercuriques par les radicaux libres des acides aminés de la chaîne protéique, nous pouvons citer celles des groupements « sulfhydriles » des restes cystéines.

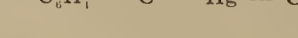
La cystéine est un acide aminé qui possède un groupement « SH » libre :



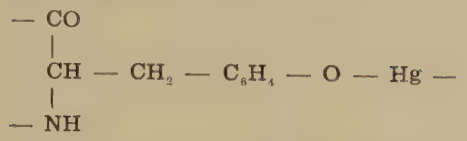
Un ion mercurique peut être fixé par deux restes cystéine en donnant :



Les radicaux « Phénol » de la tyrosine sont également aptes à fixer le mercure ; en effet, d'après Neogi et Chattergi, le chlorure mercurique agit sur les éthers phénoliques pour donner un composé mercurique de la formule suivante :



Avec la tyrosine, nous aurons :



Les protéines ayant ainsi fixé du mercure par des liaisons ioniques ont une action fongicide, comme l'ont prouvé les expériences faites sur le sérum sanguin ; mais cette action est seulement comparable à celle des dérivés mercuriques minéraux, donc très inférieure, pour une égale proportion de mercure, à celle des dérivés organo-mercuriques comme le M.M.D.D. ou le C.M.E.M. S.

c) *Hypothèse sur l'augmentation du pouvoir fongicide.*

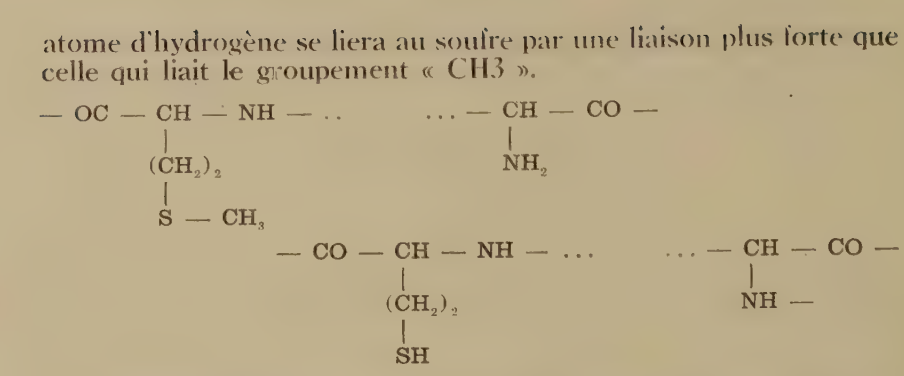
On ne peut expliquer l'augmentation du pouvoir fongicide dans le pain qu'en admettant la reformation, durant les 4 mois de vieillissement, de composés organo-mercuriques nouveaux. Ces nouveaux composés possèdent peut-être une action fongicide supérieure à celle du M.M.D.D. puisqu'elle compense, d'une part, la volatilisation partielle de ce composé lors de la cuisson, et, d'autre part, le fait que tout le mercure fixé par les protéines ne doit pas être retransformé en organo-mercuriques vrais. Ceux-ci peuvent provenir d'une réaction de transfert du mercure de ses combinaisons ioniques à d'autres radicaux avec lesquels il contracte alors des liaisons comparables à celles existant dans les fongicides organo-mercuriques du commerce.

Peut-on envisager la possibilité de telles réactions de transfert ? Nous avons pensé étayer notre hypothèse par l'exemple suivant :

Cette réaction pourrait avoir lieu à partir des restes méthionine (qui entrent dans la constitution de presque toutes les protéines) de la chaîne peptidique ayant fixé le mercure. La méthionine est considérée comme le principal agent de méthylation biologique, car il possède un groupement méthyle relié à un atome de soufre par une liaison labile :

Les restes de méthionine peuvent conduire à la méthylation des ions mercuriques, selon une réaction pour laquelle nous proposons le schéma suivant : au sein de la chaîne protéique, le groupement méthyle du reste méthionine peut être remplacé par un atome d'hydrogène provenant d'un groupement aminé libre. Cet

atome d'hydrogène se liera au soufre par une liaison plus forte que celle qui liait le groupement « CH3 ».



Le radical méthyle ainsi libéré est susceptible de se fixer sur l'une des molécules de mercure unies aux protéines (P) par des liaisons ioniques fragiles, pour donner :

$$(P) - Hg - CH_3$$

La présence du groupement méthyle conférant à la molécule le pouvoir fongicide élevé d'un dérivé organo-mercurique.

CONCLUSION

En définitive, ces expériences mettent en évidence que le mercure n'a pas été totalement éliminé au cours de la panification.

Bien au contraire, nous devons admettre un transfert chimique de ce métal, de sa copule organique initiale vers d'autres constituants du pain, en particulier les protéines du gluten ; le complexe mercurique néo-formé présentant un effet fongicide au moins comparable au produit initial.

E. — ETUDE D'UNE SOUCHE DE PENICILLIUM FONGICIDO-RESISTANTE

1° Sélection accidentelle de la souche.

Les résultats exposés dans ce chapitre ont été obtenus en utilisant une souche de Penicillium différente de celle qui avait été choisie à l'origine de nos travaux. Ce Penicillium, baptisé C.B., présente une résistance plus grande (à l'action fongicide des composés organo-mercuriques) que le Penicillium Roqueforti F.P.

Son accidentelle sélection est due à une « faute de manipulation ». Afin d'éviter les incessants repiquages nécessaires à la conservation d'une souche pure, nous avons pensé exploiter le fait que l'inhibition de la germination des spores de Penicillium exige une dose de fongicide nettement supérieure à celle suffisant à empêcher le développement des autres moisissures saprophytes courantes.

Nous avons, dès lors, repiqué notre souche sur un milieu expérimental enrichi en fongicide (M.M.D.D.) à une concentration inhibant tout autre développement fongique que celui de Penicillium Roqueforti.

Les repiquages successifs du Penicillium sur ces milieux fongicides nous ont conduit à la sélection de la souche résistante G.B.

Nous avons dû identifier cette souche pour déterminer s'il s'agissait d'une souche fongicido-résistante de Penicillium Roqueforti ou d'un Penicillium d'une espèce différente, normalement plus résistante que lui à l'action des anti-cryptogamiques.

Nous avons pu démontrer, grâce aux travaux de Sartory et surtout à ceux de Meis (10), que la souche G.B., étudiée au point de vue macroscopique (forme et couleur des colonies), microscopique (examen du conidiophore et des conidies) et biologique (détermination des substances dégradées et des acides organiques produits), était bien un Penicillium de l'espèce Roqueforti, qui ne se différencie de la souche F.P. que par sa résistance accrue aux fongicides organo-mercuriques.

2° Spécificité de la fongicido-résistance de la souche G.B.

Sélectionnée par repiquages successifs sur des milieux enrichis en M.M.D.D., la fongicido-résistance de cette souche pouvait être spécifique de ce seul fongicide, représentant alors un véritable « réactif biologique » de ce composé organo-mercurique.

Les expériences, dont nous exposons ci-dessous les résultats, montrent qu'il n'en est rien.

La détermination de la spécificité a été réalisée au moyen de cultures comparées des deux souches : F.P. et G.B. de Penicillium Roqueforti, dans des milieux composés de liquide de Raulin additionné de divers fongicides.

Introduits dans les milieux nutritifs à la dose de 0,1 % les fongicides mercuriques (organiques ou minéraux) nous permettent de constater un même degré de résistance de la souche G.B. par rapport à la souche F.P. :

Fongicides mercuriques à 0,1 %	*Penicillium souche G.B.*	*Penicillium souche F.P.*
M.M.D.D.	+	0
C.M.E.M. S	+	0
C.M.E.M. M	+	0
C.M.E.M. V	+	0
Chlorure mercurique	+	0

Tableau montrant la germination et la croissance mycellienne (+) ou l'absence de germination (0) des conidies ensemencées.

Le Penicillium souche F.P. est inhibé dans les cinq boîtes de Petri, tandis que tous les ensemencements faits avec la souche

G.B. poussent, marquant ainsi la résistance de la souche à l'égard de chacunes des substances employées, y compris le chlorure mercurique.

Lorsque les conidies de nos deux souches sont ensemencées dans des milieux contenant des fongicides non mercuriques, elles se comportent de façon identique : leur germination est inhibée pour les mêmes doses de principe actif.

C'est ce que résume le tableau suivant :

Fongicide	*Concentration*	*Souche G.B.*	*Souche F.P.*
Oxyquinoléine	1/1000	0	0
	1/2000	+	+
Désogène	1/1000	0	0
	1/2000	0	0
	1/2500	+	+
Pentachloro-phenate de Na	1/1000	0	0
	1/2000	0	0
	1/2500	0	0

La souche G.B. ne présente pas de résistance particulière aux fongicides ne contenant pas de mercure.

En résumé, la fongicido-résistance de la souche G.B. sélectionnée est spécifique du mercure, qu'il soit sous forme de composé organique ou de sel minéral.

3° Evaluation quantitative de la résistance (degré de résistance) aux fongicides organo-mercuriques du Penicillium Roqueforti souche G.B.

Ce degré de résistance a été obtenu en déterminant pour chacune de nos deux souches : F.P. et G.B., les doses liminaires des fongicides organo-mercuriques étudiés, et en faisant le rapport de ces doses.

Le tableau suivant expose les résultats fournis par des cultures effectuées en milieu liquide :

Fongicide	*Dose liminaire pour Pen. G.B.*	*Dose liminaire pour Pen. F.P.*	Rapport
M.M.D.D.	1/700	1/1300	1,85
C.M.E.M. S	1/650	1/1300	2
C.M.E.M. M	1/450	1/1050	2,33
C.M.E.M. V	1/550	1/1050	1,91

Le Penicillium Roqueforti souche G.B. est donc environ deux fois plus résistant aux fongicides organo-mercuriques que la souche F.P., en milieux liquides. Il en est de même pour les milieux solides : les pains contenant 1 % de M.M.D.D. sont suffisamment fongicides (après quatre mois de vieillissement) pour inhiber le Penicillium F.P. alors qu'il faut 2 % de ce principe actif pour obtenir le même résultat avec la souche G.B.

L'utilisation au cours de nos travaux d'une souche de Penicillium résistante présentait un double inconvénient. D'une part, résistant à des doses deux fois plus élevées de principe fongicide que le Penicillium F.P., il réduisait considérablement la marge existant entre la dose liminaire active sur la moisissure verte et celle inhibant la fermentation due à la levure. D'autre part l'emploi de la souche G.B. aurait pu nous masquer l'augmentation du pouvoir fongicide des pains à base de M.M.D.D. (acquisition représentant la partie la plus importante de nos recherches, à notre avis) bien que ce phénomène prenne une plus grande valeur.

Au terme de ce chapitre, nous pouvons conclure qu'il est possible d'obtenir un pain bien levé, âgé de 4 mois, inhibant totalement la germination de Penicillium Roqueforti souche F.P. en lui incorporant au moins 1 % de principe fongicide organo-mercurique du commerce, et au plus 2 %. (*)

Toutefois, ce pain, dont le fongicide est incorporé au cours du pétrissage, est coloré.

Retrouver les conditions possibles de la pollution de la farine telle qu'elle a pu se produire à Pont-Saint-Esprit, nous permettra peut-être d'obtenir un pain fongicide blanc.

(*) Remarquons que les fongicides organo-mercuriques du commerce étudiés ici ont une action anticryptogamique de valeur très voisine : Ils inhibent la germination du Penicillium F.P. à la concentration de 0,1 % environ, en milieu liquide et à celle de 1 % en milieu solide (pain).

Chapitre III

APPLICATION A L'ACCIDENT DE PONT-SAINT-ESPRIT des résultats de nos recherches

L'accident de Pont-Saint-Esprit, qui nous a donné l'idée de ce travail, avait été causé, comme l'ont démontré les experts, par la panification d'une farine polluée par un fongicide organo-mercurique, hydrosoluble et volatil.

Le problème posé était d'obtenir une farine qui puisse nous permettre de faire un pain blanc, levant normalement et présentant une action fongicide totale à l'égard de Penicillium Roqueforti souche F.P. Cette action fongicide doit être obtenue par l'utilisation d'un produit anticryptogamique organo-mercurique et volatil : parmi ceux que nous avons déjà utilisés le M.M.D.D pourrait répondre à cette définition. C'est lui qui sera employé dans cet essai. Mais le comportement du M.M.D.D. pendant la panification rend le problème posé très difficile à résoudre : nos précédents travaux indiquent que l'action fongicide des pains réalisés avec une farine polluée par du M.M.D.D. ne sera stabilisée qu'après 4 mois de vieillissement.

Nous avons alors décidé d'opérer en deux étapes : obtenir un lot de farines blanches enrichies en M.M.D.D. et présentant (de la dose liminaire fongicide à diverses concentrations supérieures) une action léthale à l'égard de Penicillium Roqueforti. Puis à partir de ces farines, réaliser des pains blancs fongicides pour le même micro-organisme saprophyte.

Nous pouvons ainsi, après chaque essai de reconstitution de la farine polluée, tester rapidement cette farine et juger si nous avons atteint le but poursuivi.

Deux hypothèses permettaient d'aborder l'étude de cette reconstitution :

1° la farine utilisée pouvait provenir de blé traité par le principe organo-mercurique,

2° la farine pouvait avoir été accidentellement souillée pendant son transfert ou son stockage.

1° Etude du pouvoir fongicide de farines obtenues par mouture d'un blé traité.

C'est la mise en évidence d'un fongicide agricole, du groupe fréquemment utilisé des organo-mercuriques, qui nous a conduit à penser que la farine aurait été obtenue à partir d'un blé imprégné de fongicide et destiné à être semé. Les grains traités auraient été envoyés par erreur à la meunerie.

Les organo-mercuriques ont en effet pour principal emploi la désinfection des semences, désinfection qui a pour but d'éviter au blé de nombreuses maladies cryptogamiques transmises par les graines, telles les fusarioses, caries, rouille, charbon, etc...

Ce blé aurait subi à la meunerie les habituelles opérations de mouture et de bluttage. Il n'est pas interdit de penser que si le colorant, dans sa majeure partie, reste sélectivement fixé sur les téguments, c'est-à-dire sur le « ligneux » du rebut (son, rebulet et repasse), une partie du principe actif, après l'avoir traversé, ait pu polluer la matière amylacée du cotylédon. S'il en était ainsi, la farine pourrait être blanche et fongicide.

En grande culture la désinfection des semences, dans le cas des fongicides liquides et en particulier du M.M.D.D. s'effectue de la manière suivante :

Un quintal de blé est placé dans un cylindre incliné pouvant tourner autour de son axe. On verse lentement 200 ml. de M.M.D.D. le long de la paroi en faisant tourner le cylindre (la toxicité des fongicides organo-mercuriques utilisés obligent de pratiquer cette opération en plein air ou dans un local bien aéré).

Pour l'expérience que nous avons voulu réaliser au laboratoire, nous sommes obligés de nous contenter de traiter 10 kg. de blé par 20 ml. de M.M.D.D. le mélange étant effectué par un agitateur mécanique de laboratoire.

Une autre expérience est réalisée en employant 100 ml. de fongicide et 10 kg. de blé, ceci afin d'utiliser une dose de principe actif (1 p. 100) que nous savons inhibitrice pour les 4 champignons tests.

En broyant le blé traité à l'aide d'un « mixer », nous avions cru pouvoir le diviser rapidement et en quantité relativement abondante, en farine et en son. Mais cet appareil broie finement le blé, sans séparer la farine des téguments du grain. C'est ainsi que le blé traité par 1 p. 100 de M.M.D.D. ne permet d'obtenir après tamisage

(même au tamis 240) qu'une farine rose, dont l'étude microscopique montre de très nombreux fragments de tissu végétal ligneux (les enveloppes de caryopse), colorés en rouge.

Cette farine est fongicide. Les nombreuses cultures négatives de Penicillium F.P. obtenues, avec comme substrat cette farine mélangée de milieu de Raulin, ne peuvent pas nous permettre de conclure. La farine réalisée selon ce procédé mais à partir d'un blé traité par 0,2 p. 100 de M.M.D.D. est rose pâle et permet aux conidies de Penicillium Roqueforti F.P. de germer.

En définitive nous avons dû mettre au point une technique plus proche des opérations de meunerie.

Pour obtenir une farine blanche nous avons écrasé les grains de blé au mortier, méthode qui, si elle permet une bonne séparation de la farine et du rebut, est très longue car elle ne nous autorise à traiter à la fois qu'une très petite quantité de blé. La faible quantité de farine retirée du tamisage n'est pas suffisante pour pétrir des pains, comme nous nous l'étions proposé.

Toutefois la farine recueillie est blanche, quel que soit le blé traité : celui qui a reçu 0,2 p. 100 de M.M.D.D. comme celui qui en a reçu 1 p. 100. Mais sur ces deux farines, les cultures de Penicillium sont toujours positives, aucune des deux n'est fongicide pour lui.

Le principe actif du M.M.D.D. est donc arrêté par les téguments du grain de blé en même temps que le colorant. S'il pénètre du principe actif, c'est en quantité trop faible pour inhiber la germination du Penicillium, mais cette quantité aussi faible soit-elle, pourrait cependant conférer à la farine des propriétés toxiques.

Les phénomènes sont en fait plus complexes ; les résultats énoncés ci-dessus concernant la farine blanche, à taux de bluttage très bas (70 p. 100), qui n'est pas fongicide lorsqu'elle est totalement dépourvue de ligneux. Ce n'est pas absolument le cas dans les farines couramment utilisées en panification et moins encore pour celles que l'on emploie dans les périodes de soudure difficile ce qui, semble-t-il était le cas à Pont-Saint-Esprit. Notre expérience prouve avant tout que le principe fongicide étant sélectivement fixé sur les enveloppes du caryopse et pénétrant peu au niveau des réserves amylacées du cotylédon, l'intoxication sera d'autant plus grave que la farine est plus riche en éléments ligneux (taux de bluttage élevé : 85 à 90 p. 100).

Il est donc difficile d'admettre qu'une farine normale puisse, bien qu'elle ait été obtenue à partir de grains traités, déclancher une intoxication aussi effroyable et aussi rapide que celle constatée à Pont-Saint-Esprit. Il n'en reste pas moins que des accidents moins spectaculaires peuvent être provoqués par ces farines et nous rappelons en effet qu'un produit analogue utilisé pour le traitement d'un blé envoyé accidentellement à la mouture aurait été à l'origine d'une assez grave intoxication en Suède.

2° Etude du pouvoir fongicide de farines directement souillées par le principe organo-mercurique.

Si l'hypothèse de l'emploi d'un blé de semence traité est rejetée il faut admettre une pollution directe de la farine par le fongicide.

A première vue cette pollution directe ne semble pas possible. En dehors des précautions qui devraient être prises pour préserver la farine panifiable de tous risques de souillure, l'addition à une farine d'un fongicide coloré, à une concentration telle que les pains réalisés avec elle soient fongicides pour le Penicilium (1 p. 100 en ce qui concerne le M.M.D.D.), devrait rendre celle-ci suspecte du seul fait de la coloration qu'il doit lui conférer.

Nous avons cependant réalisé l'expérience, dirigés comme nous l'étions par les travaux des experts ayant élucidé l'affaire de Pont-Saint-Esprit et par la découverte faite par eux de sacs à farine largement tachés par un colorant rouge, fluorescent en lumière de Wood.

L'expérience a été réalisée selon le protocole suivant :

Nous plaçons dans un morceau de toile à sac 1 kg. de farine, l'ensemble est mis dans une coupelle au fond de laquelle 50 ml. de la préparation commerciale (colorée) de M.M.D.D. ont été versés.

Bien que l'absorption du pesticide soit totale en 15 minutes, le sac contenant la farine n'est retiré de la coupelle que 2 heures après. La farine recueillie est rigoureusement blanche. Après l'avoir consciencieusement homogénéisée, nous testons son pouvoir fongicide.

Il est difficile de déterminer la quantité de principe actif absorbée par cette farine, les 50 ml. de M.M.D.D. se répartissant entre le résidu demeuré adhérant à la coupelle, le volume absorbé par le sac et celui ayant pénétré la farine. D'autre part, il faut en outre déduire une appréciable partie du principe actif absorbée et fixée au contact de la toile par la farine sous la forme d'une croûte adhérante. Cette croûte de farine ne tombe pas lors de la vidange du sac, elle se détache seulement au raclage, nous ne l'avons donc pas utilisée. Il est toutefois intéressant de noter qu'elle contient encore des traces de colorant (notamment contre la paroi du sac).

Nous avons donc jugé préférable d'évaluer la dose de fongicide contenue par la farine de la manière indiquée ci-après :

La quantité de principe fongicide absorbé est évaluée en faisant des dilutions de titre connu de cette farine dans une farine témoin (non fongicide). On s'assure de l'action inhibitrice de ces dilutions sur le Penicillium Roqueforti F.P. en les utilisant comme substrat sur lequel ce micro-organisme est ensemencé. Ces cultures de Penicillium sont comparées à d'autres cultures faites sur de la farine témoin additionnée directement de la préparation commerciale de M.M.D.D. à diverses concentrations connues.

Les nombreuses cultures réalisées nous ont permis d'établir le tableau suivant :

Farine de Reconstitution		*Farine Témoin et M.M.D.D.*	
Taux de dilution	*Pouv. fongicide (temps de germination des spores)*	*Pouv. fongicide (temps de germination des spores)*	*Concentration en M.M.D.D.*
pure	total	total	2 p. 100
1/2	total	total	1 p. 100
1/4	total	5 jours	0,8 p. 100
1/6	4 jours	4 jours	0,5 p. 100
1/8	3 jours	3 jours	0 p. 100

Légende : **Le pouvoir fongicide est « total » lorsque les spores de Penicillium ne peuvent pas germer. « 4 jours » indique le temps nécessaire pour que la germination des spores soit visible à l'œil nu.**

Nous voyons dans ce tableau que la farine de reconstitution diluée au quart par de la farine témoin est encore fongicide vis-à-vis de Penicillium Roqueforti F.P. comme l'est dans les mêmes conditions expérimentales la farine témoin additionnée de 1 p. 100 de M.M.D.D. On peut donc considérer approximativement la farine de reconstitution comme contenant environ 4 ml. de M.M.D.D. pour 100 gr. : les 1.000 gr. de farine auraient absorbé une quantité de principe actif correspondant à celle contenue dans 40 ml. de préparation commerciale de M.M.D.D.

Pains réalisés avec la farine de reconstitution :

La quantité de farine polluée, obtenue par le procédé décrit plus haut, nous a permis de faire des pains.

Employée pure (titre estimé approximativement à 4 p. 100) la farine de reconstitution ne permet la fabrication que de pains dont la levée est à peine ébauchée, mais qui présentent dès leur sortie du four, une action fongicide élevée à l'égard de Penicillium F.P. dont les spores ne peuvent germer.

Les pains obtenus avec cette farine, diluée au demi, par de la farine témoin (titre estimé à peu près à 2 p. 100) lèvent encore mal, les alvéoles de la mie sont de faible volume. Les spores de Penicillium sont encore fortement inhibés, ils ne germent qu'après un temps de latence qui atteint 6 à 7 jours.

La farine de reconstitution additionnée de 3/4 de farine témoin (titre estimé à 1 p. 100) permet d'obtenir des pains présentant *une levée normale mais ne présentant qu'une faible action fongicide* sur le Penicillium (phénomène de fongostase seulement traduit par

un retard de 2 ou 3 jours de la germination des spores de la moisissure saprophyte).

La constatation faite lors de nos précédentes expériences que le pouvoir fongicide augmente au cours du vieillissement, dans le cas de pains réalisés avec un anti-cryptogamique organo-mercurique volatil, nous a conduit à tester ces pains, une seconde fois, 4 mois après leur cuisson : les 3 pains se montrent alors totalement fongicides à l'égard de Penicillium Roqueforti F.P. ; toutes les cultures ensemencées demeurent stériles.

M. le Professeur PELLISSIER, notre Maître, nous fit d'ailleurs remarquer à cette occasion qu'il en avait été de même avec les pains toxiques de Pont-Saint-Esprit dont la propriété fongicide n'était découverte qu'après avoir épuisé toutes les hypothèses d'ergotisme, de lathyrisme et autres souillures naturelles possibles, en février 1952, alors que l'accident remontait au 16 août 1951, soit 5 ou 6 mois auparavant.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Arrivé au terme de l'étude du problème qui nous était posé : les conditions de la panification de farines polluées par des principes organo-mercuriques fongicides, il nous faut conclure.

Ce travail a été abordé objectivement par l'utilisation de farines et de pains enrichis par nos soins en fongicides organo-mercuriques du commerce se rangeant en deux catégories :

a) Produits hydrosolubles volatils dont le type est le Methyl Mercure Dicyan Diamide (M.M.D.D.) ;

b) Produits hydrosolubles non volatils comme le Chlorure de Methoxy Ethyl Mercure (C.M.E.M.).

Il nous a conduit aux résultats synthétisés ci-après :

A. — DANS LE CADRE DE LA MISE EN EVIDENCE ET DE L'EVALUATION QUANTITATIVE DES COMPOSES ORGANO-MERCURIQUES

1° Le dosage des principes organo-mercuriques n'a pu être réalisé que par des méthodes biologiques (ce qui confirme les recherches de M^me^ G. Deltort), mais la mesure de l'activité fongicide a été simplifiée par l'utilisation d'un seul champignon test : le Penicillium Roqueforti (THOM.), celui-ci s'étant avéré le plus résistant.

2° La dose liminaire fongicide d'un dérivé organo-mercurique à l'égard des moisissures saprophytes peut varier dans de larges limites, selon qu'il est appelé à agir en milieu solide ou en milieu liquide. C'est ainsi que l'inhibition de la germination des spores de Penicillium Roqueforti nécessite une concentration en produit anti-cryptogamique dix fois plus élevée lorsque l'ensemencement est effectué sur pain pulvérisé imbibé de liquide de Raulin.

3° Les principes organo-mercuriques hydrosolubles et volatils (comme le M.M.D.D.) sont totalement fongicides pour Penicillium Roqueforti à la dose de 1 p. 100 en milieu solide.

En vérité, nos expériences ont mis en œuvre deux souches de Penicillium Roqueforti :

a) la souche F.P. (entretenue sur milieu de Raulin neutre gélosé), stable et non fongicido-résistante ; l'inhibition totale de la germination de ses spores est atteinte pour une concentration de 1 p. 100 en M.M.D.D. (en milieu solide) ;

b) la souche G.B. (obtenue par repiquages successifs sur des milieux contenant du M.M.D.D.). Cette souche est fongicido-résistante. Nous avons démontré que cette propriété est sélective, spécifique seulement pour l'ensemble des fongicides à base de mercure (dérivés organiques et sels minéraux).

La souche G.B. représente pratiquement un réactif des dérivés mercuriques fongicides. L'inhibition totale de la germination de ses spores n'est atteinte que par une concentration en M.M.D.D. de 2 p. 100 (sur milieu solide).

B. — LA PRESENCE DE SUBSTANCES ORGANO-MERCURIQUES DANS LES FARINES DESTINEES AUX BOULANGERIES NOUS CONDUIT A DES ACQUISITIONS INATTENDUES

1° Dans le cadre de la panification, nous avons établi qu'il est impossible d'obtenir avec une farine polluée par un principe organo-mercurique volatil un pain qui, *à l'état frais, est à la fois caractérisé par une levée normale* (absence d'action fongicide ou fongostatique sur la levure de boulangerie, Saccharomyces Ellipsoïdeus (HANS.) *et un pouvoir fongicide total* pour Penicillium Roqueforti souches F.P. et G.B. (inhibition de la germination de toutes les spores ensemencées).

2° *Au cours du vieillissement de ces pains* (conservés à l'abri de l'humidité et de la lumière), le pouvoir fongicide augmente pour atteindre un maximum en 4 mois. Cette évolution du pouvoir fongicide se rencontre seulement dans les pains contenant un principe hydrosoluble volatil (type M.M.D.D.).

De sorte que, dans un pain titrant 1 p. 100 de M.M.D.D. (à ce taux, il lève bien), le pouvoir fongicide à l'égard de Penicillium Roqueforti F.P. non perceptible sur pain frais, se manifeste après 4 mois de vieillissement.

Il en résulte que, dans une expertise médico-légale, un pain normalement levé peut être fongicide pour les moisis-

sures et le Penicillium, sans que l'on puisse nécessairement conclure à l'introduction du toxique après la panification ; il suffit de savoir que le test fongicide a été effectué tardivement.

3° Par contre, au cours de leur conservation, les pains fongicides obtenus avec des principes non volatils à base de C.M.E.M. conservent inchangés le même pouvoir fongicide.

4° Nous interprétons cette évolution du pouvoir fongicide en fonction du temps par l'hypothèse suivante :

A l'état frais, les pains contenant 1 p. 100 de M.M.D.D. ne possèdent sur Penicillium Roqueforti F.P. qu'une faible action fongostatique. *L'instabilité relative de la molécule* de Methyl Mercure Dicyan Diamide nous permet de penser que ce fait est dû à la destruction de ce composé par la chaleur, au cours de la cuisson. *Les ions mercuriques libérés peuvent se fixer sur certains groupements des protéines du gluten par des liaisons ioniques.* Au composé organo-mercurique succède ainsi un produit dont le pouvoir fongicide, comparable à celui d'un sel minéral de mercure, est beaucoup plus faible. Cette hypothèse est plausible mais pour expliquer l'augmentation du pouvoir fongicide dans le pain, au cours du vieillissement, il faut admettre la *reformation de composés organo-mercuriques nouveaux pouvant provenir d'une réaction de transfert du mercure de ses combinaisons ioniques à d'autres radicaux avec lesquels il contracte des liaisons par covalence comparables à celles qui existent dans les organo-mercuriques utilisés comme fongicides.*

5° Transposés au domaine médico-légal et au cas particulier de l'affaire de Pont-Saint-Esprit, ces acquisitions nous ont permis une reconstitution possible de l'accident.

Il est peu probable que les pains toxiques aient été obtenus à partir de farines provenant de la mouture de grains traités.

Il est plus vraisemblable que le produit a pollué la farine en sac. Nous avons démontré comment le colorant du produit fongicide liquide reste sélectivement fixé sur la toile, tandis que le principe anticrytogamique pénètre la farine qui demeure blanche.

En effet, avec cette farine polluée, nous avons préparé un pain blanc présentant une levée normale et dont le pouvoir fongicide, très faible à l'état frais, est devenu, après quatre mois de vieillissement, suffisant pour inhiber la germination

des spores des champignons saprophytes. Il est intéressant de noter que c'est seulement après six mois de recherches sur les pains toxiques de Pont-Saint-Esprit, que le pouvoir fongicide des échantillons suspects avait été mis en évidence dans le laboratoire de M. le Professeur Pellissier.

VU
Le Président :
PELLISSIER.

VU et APPROUVE
Pour le Doyen,
L'Assesseur :
J. DELPHAUT.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Aix, le 3 juillet 1956.
Pour le Recteur,
Le Doyen délégué :
Signé :

BIBLIOGRAPHIE

1 — *Bulletin de l'Association Professionnelle de Phytopharmacie*, t. 12.

2 — *Bulletin Soc. Pharm. Mlle.*, 1954, 11 p. 159.

3 — FABRE. - *Leçons de toxicologie* - Hermann et C° Ed. Paris 1945.

4 — FABRE, TRUHAUT et VIEIL. - *Toxicologie des produits phytopharmaceutiques* - *Annales des Epiphyties*, 1954, n° 2, p. 182 - 187.

5 — FREAR. - *Chemistry of insecticides, fungicides and herbicides* - Van Nostrand Cy. Inc. Ed. N.Y. 1948, p. 250 - 254.

6 — HUNTER, BOMFORD et RUSSEL. - *Quart. J. Med.* 33, 193.

7 — HUSGEN H. - *Biochem Zeitschr.*, 112, 1, 1920.

8 — LEBEAU et COURTOIS. - *Traité de pharmacie chimique.* - Masson et C°, 1946, t. 3, p. 3181 - 3198.

9 — LUNDGREN K. et SWENSSON A. - *J. Ind. Hyg.* 31, 190, 1949.

10 — MEISS J.J. - *Essai de classification raisonnée des espèces appartenant au genre Penicillium Linck.* - Thèse Strasbourg 1949.

11 — RAUCOURT et SAYEGH. - *Les fongicides organiques de synthèse.* Phytoma Oct. 1952, n° 41, p. 30.

12 — SWENSSON A. - *Investigations on the toxicity of some organic mercury compounds which are used as seed desinfectants.* - Acta Med. Scandinavica. Vol. 143, Fasc. 5 1952, p. 366 - 384.

12 — TILEMANS et DORMAL - La toxicité des produits anti-parasitaires. - *Revue de l'agriculture*, août 1954, n° 8, p. 9 - 10.

14 — *Travaux de la Soc. de Ph. de Montpellier*, 1954, t. XIV, Fasc. III, p. 223.

15 — WIEN R. - *Quart. J. Pharm.*, 12, 212, 1939.

TABLE DES MATIÈRES

Avant-Propos 9
Introduction 11
Objet du travail 13
Plan général 15

PREMIERE PARTIE

LES COMPOSES ORGANO-MERCURIQUES

Etude de substances fongicides de synthèse appartenant au groupe des organo-mercuriques 19
Législation des fongicides organo-mercuriques 25
Toxicologie des organo-mercuriques fongicides 27
Traitement des intoxications 31

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES

Chapitre Premier

Investigations préliminaires 35
A) Protocoles expérimentaux 36
a) Détermination de la dose liminaire fongicide pour le Penicillium Roqueforti en liquide de Raulin 36
b) Détermination de la d.l.f. sur substrat solide, la pâte 37
c) Détermination de la d.l.f. sur substrat solide, le pain 37
B) Résultats expérimentaux 38
a) En milieu liquide 38
b) En milieu solide : la pâte 39
c) En milieu solide : le pain 39

Chapitre II

Etude de pains obtenus à partir d'une pâte contenant un principe fongicide 41
A) Technique de fabrication 41
1° Pains témoins 41
a) Confection de la pâte 42
b) Levée 42
c) Cuisson 42

2° Pains fongicides 42
a) Mode d'expression du pourcentage de substance fongicide introduite dans le pain 42
b) Obtention d'un pain blanc 43
c) Incorporation du fongicide 44
d) Fermentation panaire 44
e) Cuisson 46

B) Etude du pouvoir fongicide des pains 46
a) Technique de détermination du pouvoir fongicide de la pâte 47
b) Technique de détermination du pouvoir fongicide du pain 47

C) Résultats expérimentaux 47
1° Fongicides commerciaux décolorés 48
2° Fongicides commerciaux non décolorés 49
a) Fongicides non volatils 49
b) Fongicides volatils 50

D) Persistance du principe actif et évolution du pouvoir fongicide 51
1° Mise en évidence de l'augmentation du pouvoir fongicide avec le vieillissement 51
2° Interprétation possible de la variation du pouvoir fongicide 53
a) Instabilité du M.M.D.D. 53
b) Fixation des ions mercuriques sur les protéines sériques 54
c) Hypothèse sur l'augmentation du pouvoir fongicide .. 59
Conclusion 60

E) Etude d'une souche de Penicillium fongicido-résistante 60
1° Sélection accidentelle de la souche 60
2° Spécificité de la fongicido-résistance de la souche G.B. .. 61
3° Evaluation quantitative de la résistance aux fongicides organo-mercuriques du P.R. souche G.B. 62

Chapitre III

Application à l'accident de Pont-Saint-Esprit des résultats de nos recherches 65

Conclusions générales 71
Bibliographie 77